



**HAL**  
open science

**Démarche d'ingénierie écologique en santé des plantes :  
étude du rôle des couvre-sols végétaux des vergers dans  
l'émergence des maladies des arbres fruitiers causées par  
*Pseudomonas syringae***

Benoit Borschinger

► **To cite this version:**

Benoit Borschinger. Démarche d'ingénierie écologique en santé des plantes : étude du rôle des couvre-sols végétaux des vergers dans l'émergence des maladies des arbres fruitiers causées par *Pseudomonas syringae*. Sciences agricoles. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 2016. Français. NNT : . tel-02798843v1

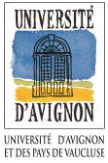
**HAL Id: tel-02798843**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02798843v1>**

Submitted on 5 Jun 2020 (v1), last revised 2 Oct 2017 (v2)

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

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



Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse  
Ecole doctorale 536 « Agrosociétés et Sciences »

## THESE

Présentée pour l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

**Démarche d'ingénierie écologique en santé des plantes : étude du rôle des  
couvre-sols végétaux des vergers dans l'émergence des maladies des arbres  
fruitiers causées par *Pseudomonas syringae***

---

**Process of ecological engineering in plant health: study of the role of orchard  
ground cover plants in the emergence of fruit tree diseases caused by  
*Pseudomonas syringae***

**Benoit BORSCHINGER**

Soutenue le 6 décembre 2016 devant le jury composé de :

Christian STEINBERG	Directeur de recherche, UMR Agroécologie, INRA Dijon	Rapporteur
Theo SMITS	Directeur de recherche, Zurich University of Applied Sciences, Switzerland	Rapporteur
Sylvaine SIMON	Ingénieure de recherche, UERI Gotheron, INRA Saint-Marcel-lès-Valence	Examinatrice
François MESLEARD	Directeur de recherche, Tour du Valat Professeur associé, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Examineur
Cindy E. MORRIS	Directrice de recherche, UR Pathologie Végétale, INRA Avignon	Directrice de thèse
Elise BUISSON	Maître de conférences, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Directrice de thèse

Thèse préparée au sein de  
l'unité de recherche Pathologie Végétale du centre INRA PACA



## Résumé :

### Démarche d'ingénierie écologique en santé des plantes : étude du rôle des couvre-sols végétaux des vergers dans l'émergence des maladies des arbres fruitiers causées par *Pseudomonas syringae*

Identifier les réservoirs et sources d'inoculum des agents phytopathogènes est un enjeu majeur en pathologie végétale. Les systèmes agricoles pérennes, tels que les vergers, sont soumis aux attaques de nombreux ravageurs et agents microbiens pathogènes. *P. syringae*, agent phytopathogène responsable de l'émergence de maladies des arbres fruitiers, dont la récente épidémie du chancre bactérien du kiwi causée *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), représente un enjeu économique important au niveau mondial. En France, les moyens de lutte sont constitués de traitements cupriques et de gestes préventifs visant à réduire la propagation de la bactérie au sein et entre les vergers. Avec la prise de conscience de la nécessité de la conservation de l'environnement par les consommateurs et producteurs, les méthodes de cultures actuelles ont tendances à s'orienter vers celles de l'agroécologie et l'usage de l'ingénierie écologique au service de la santé des plantes. En verger, la gestion des communautés de plantes des couvre-sols donne de bons résultats dans la lutte contre certaines espèces de ravageurs, tels que les arthropodes herbivores, mais les effets sur les communautés de microorganismes pathogènes restent inexplorés. Les plantes couvre-sol et adventices des vergers hébergent d'abondantes communautés de *P. syringae*, cependant le rôle de ces couverts végétaux dans l'émergence des maladies des arbres fruitiers reste incompris. Par conséquent, les travaux de recherche présentés ici focalisent sur l'étude simultanée des communautés de *P. syringae* associées aux plantes couvre-sol et aux arbres fruitiers de trois vergers d'abricotiers et de quatre vergers de kiwis du département de la Drôme, sud-est de la France, choisis pour leur état sanitaire (sain, malade ou émergence de la maladie), ainsi que des pratiques de gestion du couvre-sol différentes (sol nu, enherbement des inter-rangs, enherbement des inter rangs et rangs des arbres). En l'absence d'outils permettant une identification rapide et une affiliation à l'un des 13 phylogroupes actuellement décrits pour l'espèce *P. syringae*, l'étude du génome complet d'une cinquantaine de souches de *P. syringae* a permis la mise au point de marqueurs moléculaires capables d'identifier 9 des 13 phylogroupes. L'étude des communautés de *P. syringae* hébergées par les couvre-sols végétaux montre un effet de la composition des communautés des plantes couvre-sol sur l'abondance et la structure des communautés de *P. syringae*. La présence de *Prunella vulgaris*, une plante de la famille des Lamiaceae, est corrélée avec une diminution de l'abondance des *P. syringae*. La reproductibilité de ce résultat est actuellement en cours d'investigation dans une parcelle expérimentale. Cependant, les résultats préliminaires montrent une absence d'effet de *P. vulgaris* sur l'abondance de *P. syringae*. L'étude simultanée des communautés de *P. syringae* des couvre-sols végétaux et des arbres fruitiers montre que des échanges se font entre les deux compartiments en raison de la présence de souches génétiquement proches. Chez le kiwi, lorsque Psa est présent il coexiste toujours avec d'autres *P. syringae*, soulevant la question des interactions entre ces souches et leur rôle dans l'émergence de la maladie. Enfin, les résultats mettent en avant un potentiel antagonisme entre les phylogroupes 1 et 2.

**Mots clés :** *Pseudomonas syringae*, bactérie phytopathogène, vergers, *Prunus armeniaca*, *Actinidia deliciosa*, couvre-sols végétaux, structures des communautés, phylogénie, agroécologie, ingénierie écologique

## Abstract:

### Process of ecological engineering in plant health: study of the role of orchard ground cover plants in the emergence of fruit tree diseases caused by *Pseudomonas syringae*

Identification of reservoirs and inoculum sources of plant pathogenic microorganisms is a major issue in plant pathology. Perennial agricultural systems, such as orchards, are exposed to many pests and pathogenic microorganisms. *P. syringae*, a phytopathogenic bacterium responsible for the emergence of diseases of fruit trees, including the recent outbreak of bacterial canker of kiwifruit caused *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), represent an important economic issue worldwide. In France, means of control of bacterial canker consist of copper treatments and preventive measures in order to reduce the spread of bacteria within and between orchards. With the awareness for environmental conservation by consumers and producers, current cultivation methods tend to be progressively replaced by more agroecological ones and the use of ecological engineering to improve plant health. Ecological engineering of orchard ground cover plant communities provides good results for the control of orchard pests, such as herbivorous arthropods, but the effects on pathogenic microbial communities remains unexplored. The ground cover plants and orchard weeds host abundant *P. syringae* communities, however the role of ground covers in the emergence of fruit tree diseases remains ignored. Therefore, the research presented here is focused on the simultaneous study of *P. syringae* communities associated with ground covers and fruit trees from three apricot and four kiwifruit orchards of Drôme county, southeastern France, chosen for their health status (healthy, diseased, or disease emergence), as well as different ground cover management practices (bare soil, ground cover in inter-rows, ground cover in inter-rows and tree rows). In the absence of tools for rapid identification and affiliation to one of 13 currently described phylogroups for the *P. syringae* species, the screening of whole genomes of more than fifty *P. syringae* strains has allowed the development of specific molecular markers able to identify 9 of the 13 phylogroups. Results show that ground cover *P. syringae* community abundances and structures are correlated to plant community composition. The presence of *Prunella vulgaris*, a plant of the Lamiaceae family, is correlated to a decrease in the *P. syringae* abundances. Reproducibility of this result is currently under investigation in an experimental field. However, preliminary results from the experimental field show that the presence of *P. vulgaris* in 1-year-old ground covers is not correlated to a decrease in *P. syringae* abundances. Simultaneous study of ground cover and fruit tree *P. syringae* communities highlight bacterial exchanges between these two compartments because of the presence of genetically correlated strains in both of them. When present, Psa coexist with other *P. syringae*, raising the question of the interaction between these strains and their role in the emergence of the disease. Finally, the results highlight a potential antagonism between phylogroups 1 and 2.

**Key words:** *Pseudomonas syringae*, phytopathogenic bacteria, orchards, *Prunus armeniaca*, *Actinidia deliciosa*, ground covers, community structures, phylogeny, agroecology, ecological engineering

## Liste des publications et communications

- Borschinger, B. (Présentateur, Oral), Parisi, L., Lacroix, C., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Bourgeay, J.-F., Berge, O., Buisson, E., Morris, C. E. (2016). Ground covers in orchards: reservoirs and potential sources of inoculum of *Pseudomonas syringae*. In: 12ièmes Rencontres Plantes-Bactéries, 11-15 janvier 2016, Centre Paul Langevin 75300 Aussois (p. 71). Presented at 12. Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, FRA (2016-01-11 - 2016-01-15).
- Lacroix, C. (Présentateur, Oral), Borschinger, B., Berge, O., Parisi, L., Morris, C. E. (2016). Articulating microbiology with disease and community ecology to further understanding of pathogen emergence. In: 12ièmes Rencontres Plantes-Bactéries, 11-15 janvier 2016, Centre Paul Langevin 75300 Aussois (p. 62). Presented at 12. Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, FRA (2016-01-11 - 2016-01-15).
- Chandeysson, C. (Présentateur, Poster), Bartoli, C., Borschinger, B., Guilbaud, C., Glaux, C., Monteil, C., Sands, D. C., Morris, C. E. (2016). Mise à jour de la classification du groupe *Pseudomonas syringae* et des outils simples et rapides d'identification. In: 12ièmes Rencontres Plantes-Bactéries, 11-15 janvier 2016, Centre Paul Langevin 75300 Aussois (p. 80). Presented at 12. Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, FRA (2016-01-11 - 2016-01-15).
- Parisi, L. (Présentateur, Poster), Morgaint, B., Borschinger, B., Guilbaud, C., Chandeysson, C., Combe, F., Bourgeay, J.-F., Berge, O., Brun, L., Brachet, M.-L., Morris, C. E. (2016). Diversité et structuration des populations de *Pseudomonas syringae* en vergers d'abricotier. In: 12ièmes Rencontres Plantes-Bactéries, 11-15 janvier 2016, Centre Paul Langevin 75300 Aussois (p. 107). Presented at 12. Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, FRA (2016-01-11 - 2016-01-15).
- Borschinger, B., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Parisi, L., Bourgeay, J.-F., Buisson, E., Morris, C. E. (Auteur de correspondance) (2016). A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas syringae* phylogroups. *Journal of Applied Microbiology*, 120 (3), 714-723. DOI: 10.1111/jam.13017.
- Borschinger, B. (Présentateur, Oral), Chandeysson, C., Bartoli, C., Guilbaud, C., Parisi, L., Bourgeay, J.-F., Buisson, E., Morris, C. E. (2015). Caractérisation rapide de la diversité génétique des populations de *Pseudomonas syringae* dans les vergers et cultures par PCR multiplex. Presented at 7ème Journées des Doctorants SPE, Rennes, FRA (2015-07-01 - 2015-07-03).
- Borschinger, B. (Présentateur, Oral), Chandeysson, C., Bartoli, C., Guilbaud, C., Parisi, L., Bourgeay, J.-F., Buisson, E., Morris, C. E. (2015). New multiplex PCR method for rapid characterization of the genetic diversity of *Pseudomonas syringae* in orchards and crops. Presented at Innovation in Integrated & Organic Horticulture, INNOHORT 2015, Avignon, FRA (2015-06-08 - 2015-06-12).
- Berge, O. (Présentateur, Oral), Monteil, C. L., Bartoli, C., Guilbaud, C., Chandeysson, C., Borschinger, B., Sands, D., Morris, C. E. (2015). A broad and operational classification framework to address the ecology of *Pseudomonas syringae* populations. Presented at 9. International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens, Malaga, ESP (2015-06-02 - 2015-06-05).
- Borschinger, B. (Présentateur, Poster), Lacroix, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Parisi, L., Bourgeay, J.-F., Berge, O., Bartoli, C., Pavon, D., Buisson, E., Morris, C. E. (2015). Impact of ground cover on *Pseudomonas syringae* communities in kiwifruit orchards. Presented at 10. International symposium on phyllosphere microbiology, Ascona, CHE (2015-07-19 - 2015-07-23).
- Berge, O. (Présentateur, Oral), Bartoli, C., Guilbaud, C., Chandeysson, C., Morris, C. E., Borschinger, B. (2015). Du nouveau dans le groupe *Pseudomonas syringae* : un cadre général de classification et des outils simples et rapides d'identification. In: Taxonomie integrative : de la génomique aux collections (p. 22). Presented at 1. Colloque R-Syst / Muséum national d'histoire naturelle, Versailles, FRA (2015-10-12 - 2015-10-14).

- Parisi, L. (Présentateur, Poster), Borschinger, B., Chandeysson, C., Bourgeay, J.-F., Berge, O., Morris, C. E. (2015). Identification of the reservoirs of *Pseudomonas syringae* in *Prunus armeniaca* orchards. Presented at 2. International workshop on bacterial diseases of stone fruits and nuts, Izmir, TUR (2015-04-21 - 2015-04-24).
- Borschinger, B. (Présentateur, Oral) (2014). Démarche d'ingénierie écologique en santé des plantes : gestion des couvre-sols des vergers pour lutter contre les bactérioses des arbres fruitiers provoquées par *Pseudomonas syringae*. Presented at Journée des Doctorants de l'IMBE, Marseille, FRA (2014-07-09 - 2014-07-09).
- Borschinger, B. (Présentateur, Poster), Buisson, E., Parisi, L., Morris, C. E. (2013). Vers les démarches en ingénierie écologique pour la santé des plantes : gestion des couvre-sols des vergers pour lutter contre les bactérioses des arbres fruitiers provoquées par *Pseudomonas syringae*. Presented at Des ingénieries par et pour le vivant, écologiques et agro-écologiques, Montpellier, FRA (2013-12-19 - 2013-12-19).

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrantes de thèse, Cindy MORRIS et Elise BUISSON, pour la qualité de leur encadrement et leur disponibilité durant ces trois dernières années. Cette thèse n'aurait pas pu être rédigée sans leurs conseils, relectures et corrections. Merci de m'avoir aidé à tenir les délais qui m'étaient impartis.

Je remercie la SFR TERSYS de m'avoir octroyé le financement nécessaire à la réalisation de cette thèse.

Je remercie Marc BARDIN, directeur actuel de l'unité de Pathologie Végétale d'avoir bien voulu m'accueillir dans son infrastructure.

Je remercie Christian STEINBERG et Theo SMITS d'avoir accepté être rapporteurs, ainsi que Sylvaine SIMON et François MESLEARD d'avoir accepté être examinateurs de cette thèse.

Je remercie Christian GARY et Armin BISCHOFF, d'avoir accepté faire partie de mon comité de thèse, ainsi que pour leurs avis et conseils concernant mes travaux de recherche.

Je tiens également à remercier Solène BORNE d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, ainsi que pour son implication dans la recherche des sites d'étude et de m'avoir mis en relation avec des professionnels de l'arboriculture.

Je remercie Luciana PARISI pour son implication dans ce projet, le partage de son expérience, ainsi que ses conseils et relectures des différents manuscrits.

Je remercie Christelle LACROIX pour son implication dans la partie statistique de mes travaux de recherche et de m'avoir redonné goût à l'usage du logiciel R.

Je remercie Jean-François BOURGEAY pour son implication lors des campagnes d'échantillonnages, le partage de son expérience, ainsi que ses conseils, et d'avoir bien voulu partager son bureau avec moi ces trois dernières années.

Je remercie Daniel PAVON, sans qui les inventaires botaniques n'auraient pas pu être réalisés.

Je remercie Charlotte CHANDEYSSON et Caroline GUILBAUD pour leur aide précieuse lors du traitement des échantillons, sans lesquelles je ne serai pas parvenu terminer la rédaction de cette thèse avant la fin du temps impartit.

Je tiens à remercier Odile BERGE, toujours à l'écoute et de bon conseil.

Je remercie Claudia BARTOLI pour son implication dans la correction de mon premier manuscrit.

Je remercie Joël BERAUD, Michel PASCAL, Laurent PARADIS et Nathalie TRUGLIO pour leur implication dans la mise en place de la parcelle expérimentale.



Je tiens également à remercier Michel JOBIN et Luc DEDIEU de m'avoir permis de réaliser les enseignements des travaux pratiques de microbiologie aux étudiants de l'IUT d'Avignon, et Jean-Pierre BOUMAZA pour la préparation des outils, milieux de culture et réactifs nécessaires au bon déroulement de ces enseignements.

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'unité de Pathologie Végétale, des équipes de MYCOLOGIE et de VIROLOGIE, les stagiaires, ainsi que les doctorants que j'ai été amené à côtoyer aux cours de ces trois dernières années et qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse.

# Sommaire

<b>Avant-propos.....</b>	<b>11</b>
<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>13</b>
I. Gestion du sol et de sa couverture végétale dans les vergers.....	15
I.1. Techniques de gestion et d'élimination de la végétation du sol dans les vergers.....	16
I.1.1. Travail mécanique du sol.....	16
I.1.2. Utilisation d'herbicides.....	20
I.1.3. Utilisation de paillages.....	21
I.2. Gestion de l'enherbement, amélioration de la qualité du sol, de la santé des arbres et protection intégrée des cultures par utilisation de couvre-sols végétaux.....	24
I.2.1. Mise en place des couvre-sols et choix des espèces végétales.....	24
I.2.2. Effets généraux de la présence d'un couvert végétal dans les vergers.....	28
I.2.3. Contribution des couvre-sols végétaux à la nutrition azotée.....	33
I.2.4. Utilisation des couvre-sols végétaux comme outil de protection intégrée des cultures.....	35
I.3. Les couvre-sols végétaux, réservoirs de microorganismes pathogènes.....	37
II. <i>Pseudomonas syringae</i> : bactérie épiphyte, pathogène et glaçogène.....	41
II.1. Mode de vie épiphyte de <i>P. syringae</i> .....	44
II.2. Pouvoir pathogène de <i>P. syringae</i> .....	50
II.3. Pouvoir glaçogène de <i>P. syringae</i> .....	53
II.4. Epidémiologie des maladies provoquées par <i>P. syringae</i> chez les arbres fruitiers.....	56
II.4.1. Chancre bactérien des arbres fruitiers à noyaux.....	56
II.4.2. Chancre bactérien du kiwi, causé par <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> (Psa).....	60
II.5. Moyens de lutte actuels.....	66
<b>Contexte.....</b>	<b>70</b>
<b>Chapitre 1 : Mise au point d'une technique moléculaire permettant l'identification des principales lignées génétiques de <i>P. syringae</i>.....</b>	<b>75</b>
I. Contexte.....	76
II. Objectif.....	76
III. Résultats principaux.....	78
Article : A set of PCRs for rapid identification and characterization of <i>Pseudomonas syringae</i> phylogroups.....	79
<b>Chapitre 2 : Etude des effets de la saison, de l'espèce fruitière cultivée, ainsi que de la composition des communautés végétales sur les populations de <i>P. syringae</i> associées aux couvre-sols végétaux.....</b>	<b>101</b>
I. Contexte.....	102
II. Objectif.....	103
III. Résultats principaux.....	103
Manuscrit en cours de finalisation : Season and plant community composition influence the size and structure of <i>Pseudomonas syringae</i> populations on orchard ground covers.....	104

**Chapitre 3 : Etude de l'effet de la gestion du couvert végétal sur les populations de *P. syringae* associées aux arbres fruitiers, et des liens entre les populations de *P. syringae* des plantes couvre-sol et celles des arbres fruitiers..... 139**

I. Contexte..... 140  
II. Objectif..... 141  
III. Résultats principaux..... 141

Manuscrit en cours de finalisation : Relationship between orchard ground cover management practices and *Pseudomonas syringae* populations associated with fruit trees..... 143

**Chapitre 4 : Tentative d'ingénierie écologique appliquée aux communautés végétales du couvre-sol dans un objectif de réduction de l'abondance des *P. syringae*..... 183**

I. Contexte..... 184  
II. Objectif..... 184  
III. Résultats principaux..... 185

Résultats préliminaires d'un projet en cours : An ecological engineering trial applied to ground cover plant communities in an effort to reduce the abundance of *Pseudomonas syringae*..... 186

**Synthèse des travaux de recherche et perspectives..... 223**

**Références hors articles..... 238**

## Avant-propos

*Pseudomonas syringae*, bactérie étudiée depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle, est essentiellement connue pour son rôle phytopathogène. En réalité il s'agit d'une bactérie ubiquiste, présente en milieu naturel et agricole, dont les thématiques de recherche ont fortement évolué au cours des cent dernières années. Isolée à partir d'un lilas malade (*Syringa vulgaris* L.) par M.W. Beijerinck en 1899, puis caractérisée et nommée par C.J.J. van Hall en 1902, elle a d'abord été considérée comme une bactérie phytopathogène stricte. Son mode de vie épiphyte en association avec des plantes « hôtes » (présentant des symptômes dus à l'infection) et « non hôtes » n'a été décrit qu'à partir des années 1950-60 avec les travaux de H. English et J.E. Crosse. Dans les années 1970-80, son pouvoir glaçogène, c'est-à-dire sa capacité à rompre l'état de surfusion de l'eau, a été décrit par L.R. Maki. Entre 1980 et 2000, S. Hirano et C.D. Upper ont étudié la dynamique des populations de *P. syringae* en milieu agricole et le rôle de son pouvoir pathogène dans sa survie en tant qu'épiphyte. Enfin en 2008, l'association de l'histoire de vie de *P. syringae* au cycle de l'eau a été démontrée par C.E. Morris.

Depuis les années 2000, *P. syringae* est responsable de l'émergence de nouvelles maladies sur plus d'une vingtaine d'espèces de plantes ligneuses, et engendre actuellement des pertes économiques estimées de plusieurs dizaines à centaines de millions de dollars par an au niveau mondial. Actuellement les seuls moyens de lutte sont composés d'un certain nombre de gestes préventifs lors de l'entretien des vergers, ainsi que l'utilisation de traitements chimiques, comme par exemple les traitements cupriques dont les pulvérisations massives entraînent l'accumulation de cuivre à de fortes concentrations dans l'environnement. La prise de conscience concernant l'importance de la conservation de notre environnement, de sa biodiversité et de l'impact des activités humaines sur celui-ci, a pris de l'ampleur dans les

années 1990 (Sommet de Rio, 1992). Celle-ci a conduit progressivement à l'adoption de méthodes agricoles plus respectueuses de l'environnement, telles que la lutte biologique, le bio-contrôle et la protection intégrée des cultures.

Dans les vergers, l'un des outils de protection intégrée des cultures le plus utilisé est l'implantation de couvre-sols végétaux. Effectivement, outre leurs bénéfices concernant les propriétés physico-chimiques du sol et leur contrôle de divers paramètres physiologiques des arbres (croissance, teneurs en matières minérales, stade phénologiques, etc.), ils permettent aussi le contrôle d'un certain nombre d'espèces de ravageurs des arbres fruitiers. Cependant, le rôle de ces couvre-sols dans l'émergence de maladies et leur utilisation en tant qu'outil de protection intégrée contre les microorganismes pathogènes des arbres fruitiers, tels que *P. syringae*, reste à évaluer.

Dans cette introduction, le lecteur trouvera dans une première partie les méthodes de gestion des couvre-sols les plus couramment utilisées dans les vergers, ainsi que les effets bénéfiques liés à l'utilisation d'un couvre-sol végétal sur les propriétés physico-chimiques du sol, la biodiversité, ainsi que la santé des arbres, mais également leur rôle de réservoirs et sources hypothétiques d'inoculum de *P. syringae* pathogènes des arbres fruitiers. La seconde partie sera une synthèse des connaissances actuelles concernant *P. syringae*, agent responsable du chancre bactérien des arbres fruitiers.

## Synthèse bibliographique

---

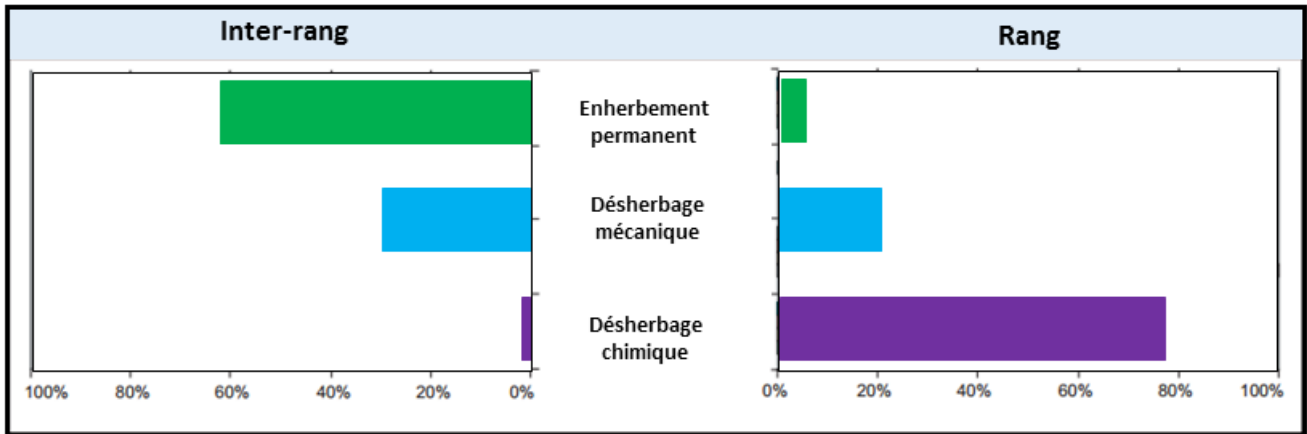


Figure 1. Gestion de l'enherbement de l'inter-rang et du rang dans les vergers français. D'après les données issues d'Agreste-Enquête Vergers 2007.

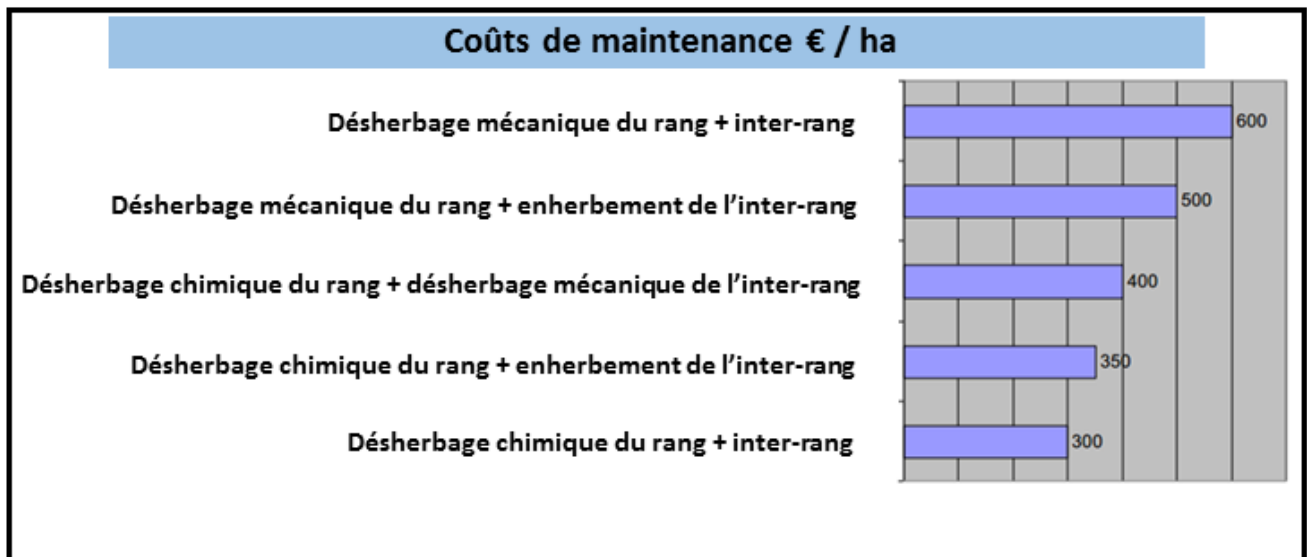


Figure 2. Coûts de maintenance, exprimés en € / ha, des différentes méthodes de gestion de l'enherbement des rangs et inter-rangs dans les vergers français. Données issues de l'enquête Vergers 2009 de la Chambre d'Agriculture France.

## I. Gestion du sol et de sa couverture végétale dans les vergers

La gestion du sol des vergers est un thème très étudié et sujet à de nombreuses préconisations parfois contradictoires. Durant la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle la gestion classique était soit le maintien d'un sol nu par un travail mécanique, l'usage des herbicides ne s'est démocratisé qu'à partir de la fin des années 1940, soit la mise en place d'un couvert végétal durant une partie de l'année puis retour à un sol nu le restant de l'année. Cette pratique était surtout utilisée durant les cinq premières années qui suivaient la plantation des vergers afin d'éviter la compétition entre le couvert végétal et les arbres pour l'eau et les nutriments durant le printemps. Parfois cette alternance de sol nu et de couvert végétal est maintenue jusqu'à la fin de vie des vergers (Haynes, 1980). A partir des années 1950, l'usage d'un couvert végétal sur l'inter-rang et le désherbage ciblé du rang a été préconisé et adopté dans la majorité des zones de production fruitière (Hogue and Neilsen, 1987; Hornig and Bunemann, 1992; Comai *et al.*, 1993)(Figure 1). En effet, cette méthode permet de cumuler les effets bénéfiques des couvre-sols végétaux (*e.g.* section I.2.2.), et éviter la compétition, pour l'eau et les nutriments, avec les arbres au niveau du rang. De plus, il s'agit généralement d'une méthode peu coûteuse et facile à mettre en œuvre par les arboriculteurs (Mantinger and Gasser, 1993)(Figure 2). Cependant, l'utilisation répétée d'herbicides engendre des dégâts environnementaux et est à l'origine d'émergence de plantes herbacées résistantes (Buser, 1990; Warwick, 1991).

Les objectifs principaux de la gestion des sols des vergers sont la facilitation du travail quotidien des arboriculteurs, l'augmentation des rendements, ainsi que la production de fruits répondant aux critères gustatifs et visuels des consommateurs. Les méthodes sont variables en fonction de la localisation géographique, des conditions climatiques locales, ainsi que des espèces fruitières cultivées (Haynes, 1980). Les références scientifiques concernant les



aspects technique de l'arboriculture, plus précisément concernant la gestion de l'enherbement des vergers, sont peu nombreuses et datent généralement des années 1950 à 1980. Globalement 4 méthodes de gestion sont régulièrement employées : celles qui visent à éliminer l'enherbement par (i) travail mécanique du sol, (ii) application d'herbicides, ou encore (iii) utilisation de paillages naturels ou synthétiques, et celle qui vise à (iv) utiliser des couvre-sols végétaux pour contrôler la germination et la pousse de plantes adventices nuisibles, améliorer les propriétés physico-chimiques du sol et la santé des arbres. Chaque méthode va avoir des conséquences différentes sur la croissance des arbres, les conditions physico-chimiques du sol, ainsi que la faune et la flore associée au sol. Dans cette partie, les effets de chaque méthode de gestion seront décrits en terminant par l'utilisation des couvre-sols végétaux.

## **I.1. Techniques de gestion et d'élimination de la végétation du sol dans les vergers**

### **I.1.1. Travail mécanique du sol**

Le travail mécanique est la technique la plus ancienne qui permet de contrôler de façon efficace le couvert végétal du sol des vergers. D'abord réalisée à l'aide d'outils tractés par des animaux puis progressivement remplacée par des machines agricoles à partir des années 1920 (Guerra and Steenwerth, 2012), cette technique permet de limiter la compétition pour les ressources entre les arbres et les plantes couvre-sol (Nielsen and Hogue, 1992). Les arbres cultivés de cette façon sont généralement plus vigoureux, ont une meilleure croissance, un meilleur rendement et donnent des fruits de plus gros calibre que ceux cultivés en présence

d'un couvert végétal (Bollard, 1957). Cette différence s'explique notamment par une réduction de la compétition pour l'azote (Bould *et al.*, 1972; Goode and Hyrycz, 1976). Globalement la teneur en azote des arbres, des feuilles et des fruits est supérieure dans les vergers à sol nu comparée à celle de vergers enherbés (Bould *et al.*, 1972; Perring, 1975; Rodriguez-Lovelle *et al.*, 2000).

Le travail mécanique du sol a également un impact sur la répartition de la matière organique. Habituellement la teneur totale en carbone et azote est supérieure dans les couches superficielles du sol et décroît dans les couches inférieures (Greenland, 1971). Lors du travail mécanique du sol cette tendance est inversée, de façon plus ou moins importante en fonction de la profondeur travaillée, avec une teneur totale en carbone et azote plus importante dans les couches inférieures (Bennett *et al.*, 1975; Blevins *et al.*, 1977). Il a également été démontré que le travail mécanique du sol favorise l'activité biologique. Effectivement, il diminue la compaction du sol et assure une redistribution de la matière organique sur toute la profondeur travaillée (Bulfin and Gleeson, 1967; Baeumer and Bakermans, 1974). Les parties profondes du sol qui se retrouvent en surface vont avoir tendance à s'assécher rapidement. Cependant, l'humidification de celles-ci va entraîner une importante activité biologique qui peut perdurer durant plusieurs jours et qui va être à l'origine d'un relargage massif de matière organique (Birch, 1958; Van Schreven *et al.*, 1970). Effectivement, le remaniement de la structure du sol favorise la mise en contact entre les microorganismes et la matière organique, et l'humidification par la pluie ou l'irrigation déclenche l'activité microbienne responsable de la libération des composés organiques (Rovira and Greacen, 1957). Les teneurs en phosphore et potassium sont généralement plus élevées dans les couches profondes des vergers dont les sols sont travaillés comparées à celles de vergers désherbés chimiquement (Shear and Moschler, 1969; Triplett and Van Doren, 1969) et ceux possédant un couvert végétal (Lord,

1976). Effectivement ces deux éléments s'infiltrent très difficilement dans le sol et ont tendance à s'accumuler au niveau de la couche superficielle dans les vergers enherbés et ceux désherbés chimiquement. Au contraire, le calcium et le magnésium sont généralement très rapidement lessivés des couches superficielles, et le travail mécanique permet une répartition homogène de ces éléments chimiques entre les différentes couches du sol. Cependant, malgré un travail régulier du sol, une diminution des teneurs en calcium et magnésium des couches superficielles du sol peut tout de même avoir lieu et nécessiter un apport externe supplémentaire (Hilkenbaumer and Kolbe, 1974). Ces éléments sont importants pour l'équilibre acido-basique du sol. Effectivement lorsque leurs teneurs diminuent dans les couches superficielles du sol on peut observer une diminution du pH (Baeumer and Bakermans, 1974).

L'utilisation excessive du travail mécanique peut engendrer une diminution de l'agrégation du sol, ce qui diminue la quantité de particules fines dans les agrégats et entraîne finalement une diminution de la teneur en matière organique (Greacen, 1958; Baver *et al.*, 1972; Cambardella and Elliott, 1993). Sur le long terme c'est une pratique de gestion qui aboutit à un sol peu favorable à l'infiltration de l'eau par formation de plaques rigides (Kenworthy, 1953), et une érosion pouvant conduire à l'exposition des racines hors du sol, les rendant ainsi vulnérables au gel et au passage des machines agricoles. A cela s'ajoute le constat que les arbres fruitiers des vergers dont les sols sont travaillés possèdent un système racinaire moins développé que ceux de vergers enherbés ou désherbés chimiquement. Effectivement en général le système racinaire va s'arrêter entre 20 et 7 cm de la surface du sol en raison de sa destruction systématique lors du passage des machines agricoles (Coker, 1959; Cockroft and Wallbrink, 1966; Cockroft and Tisdall, 1978). De plus il a été démontré que de nombreux cas de dépérissement des arbres fruitiers en vergers cultivés étaient reliés à l'endommagement du

système racinaire (Hardisty, 1966). En plus du stress mécanique, les racines des arbres fruitiers de ce type de verger vont également être plus sensibles au gel. Lors de la période hivernale, le froid a tendance à s'infiltrer plus rapidement dans les sols travaillés que ceux désherbés chimiquement, possédant un couvre sol végétal ou recouvert d'un paillage (Blasse, 1961; Will, 1962; Cooper, 1973).

Globalement, le travail mécanique du sol est également la méthode la moins favorable à l'installation d'une faune et flore stable au sein du sol des vergers (Wallwork, 1976). Effectivement, en plus des modifications des paramètres physico-chimiques du sol, de la perméabilité à l'eau, et du remaniement permanent de la structure des couches superficielles, il y a également un fort taux de mortalité dû aux machines agricoles utilisées pour labourer les sols. Les densités d'arthropodes et annélides sont plus faibles dans les vergers à sols nus et cultivés comparées à celles de vergers possédant un couvert végétal permanent (Raw, 1967; Alleinikova and Utrobina, 1975). Une étude a démontré que le travail mécanique pouvait avoir un effet bénéfique à court terme sur les populations de vers de terre (*Lumbricus terrestris*) via la redistribution de la matière organique dans les couches profondes du sol (Edwards and Lofty, 1975). Cependant de façon général sur le long terme, le travail mécanique diminue systématiquement l'abondance des populations de vers de terre (Baeumer and Bakermans, 1974; Domsch, 1977; Tisdall, 1978). Cette réduction de l'abondance de vers de terre va également avoir un effet direct sur les propriétés physico-chimiques du sol : en creusant leurs galeries, les vers participent à l'aération des sols et à la structuration de celui-ci, ainsi qu'à l'augmentation du pH via la sécrétion de composés riches en calcium produits par leurs glandes calcifères (Wallwork, 1970). Lorsque les conditions sont favorables, les vers de terre peuvent augmenter le pH du sol d'une unité en l'espace d'une centaine de jours (Leger and Millette, 1977).

### I.1.2. Utilisation d'herbicides

L'application d'herbicides est la méthode la moins chère et la plus simple à mettre en pratique par les arboriculteurs (Hogue and Neilsen, 1987; Rueger, 1991; Pfammatter, 1994; Tourte *et al.*, 2008). La largeur optimale d'application des herbicides sur le rang reste ouverte au débat, mais en général de bons résultats sont observés avec un désherbage sur une bande d'environ 60 à 100 cm de largeur (Mantinger and Gasser, 1987). Tout comme pour le travail mécanique, le désherbage chimique des sols va favoriser la croissance des arbres en évitant la compétition pour les ressources avec les plantes couvre-sol. En général ils sont appliqués uniquement sur les rangs (Hipps and Samuelson, 1991; Anderson *et al.*, 1992), afin de limiter les dégâts environnementaux et éviter au maximum les phénomènes d'érosion du sol notamment dans les vergers inclinés (Glenn and Welker, 1989).

L'usage prolongé des herbicides provoque des modifications des communautés végétales (Elmore *et al.*, 1997; Baumgartner *et al.*, 2007; Gago *et al.*, 2007; Sanguaneko and Leon, 2011). L'élimination systématique des espèces herbacées annuelles par des herbicides sélectifs entraîne très souvent un envahissement difficilement contrôlable du couvre-sol par des espèces herbacées pérennes (Elmore *et al.*, 1997). Sur le long terme l'utilisation d'herbicides favorise l'apparition d'espèces végétales résistantes telles que *Convolvulus arvensis*, *Conyza canadiensis*, *Equisetum arvense*, *Lolium multiflorum*, *Lolium rigidum*, *Senecio vulgaris* et *Setaria* sp. (Warwick, 1991; Jasieniuk *et al.*, 2008; Shrestha *et al.*, 2010). A l'heure actuelle, on dénombre plus de 190 espèces herbacées résistantes aux différents herbicides (Guerra and Steenwerth, 2012). De plus, l'utilisation répétée d'herbicides provoque une diminution de la fertilité, de la teneur en matière organique (Glenn and Welker, 1989; Hipps and Samuelson, 1991; Lipecki and Szwedko, 1995; Smith *et al.*, 2008; Steenwerth and Belina, 2010), ainsi qu'une

acidification du sol (Glenn and Welker, 1989; Lipecki and Szewo, 1995). Les herbicides ont également tendance à s'infiltrer dans les couches profondes et à contaminer les nappes phréatiques (Hall *et al.*, 1989; Buser, 1990). Afin de limiter les effets indésirables des herbicides, le désherbage se pratique désormais sur des bandes de plus en plus restreintes dans les vergers (Mantinger and Gasser, 1987). Des alternatives telles que des herbicides biologiques existent, cependant leur efficacité est généralement très réduite et le coût élevé de production n'encourage pas leur utilisation (Elmore *et al.*, 1997; Tourte *et al.*, 2008; Lanini *et al.*, 2011; Guerra and Steenwerth, 2012; Shrestha *et al.*, 2012; Ingels *et al.*, 2013; Shrestha *et al.*, 2013; Granatstein *et al.*, 2014).

### **I.1.3. Utilisation de paillages**

Les paillages peuvent remplacer partiellement ou intégralement les traitements herbicides, ils sont soit naturels, « vivants » ou « morts », soit synthétiques. Les paillages vont contrôler la germination et la pousse des espèces herbacées (Fredrikson *et al.*, 2011), augmenter la taille et la vigueur des arbres (Childers, 1961; Cockroft and Wallbrink, 1966), augmenter l'activité microbienne du sol (Sauvage, 1995; Thomson and Hoffmann, 2007), retenir l'humidité et améliorer la perméabilité du sol (Engel, 1992; Mantinger and Gasser, 1993; Pinamonti, 1998; Varga and Majer, 2003), maintenir la fertilité et augmenter la teneur en matière organique du sol (Hogue and Neilsen, 1987; Glenn and Welker, 1989; Neilsen and Hogue, 1992; Thomson and Hoffmann, 2007), améliorer la structure et prévenir l'érosion du sol (Hogue and Neilsen, 1987; Oliveira and Merwin, 2001; Nemethy, 2004), ainsi que protéger les racines du gel et des variations de températures extrêmes (Spring, 1993; Pinamonti, 1998). Cependant, l'augmentation de l'activité microbienne peut conduire à une diminution de la teneur en azote

dans les couches superficielles du sol (Mantinger and Gasser, 1987; Gasser, 1990; Webber and Gee, 1994) et certains paillages vont favoriser l'activité de rongeurs nuisibles pour les arbres fruitiers (Glenn and Welker, 1989; Spring, 1993; Merwin *et al.*, 1995). Il a également été démontré que dans certains cas l'utilisation de paillages sur les rangs pouvait augmenter le nombre de fleurs portées par les arbres, provoquer une floraison précoce et une croissance prolongée des jeunes pousses dans la saison hivernale (Engel, 1960; Baxter, 1970). Une floraison précoce et une croissance tardive peuvent être néfastes pour les arbres car les fleurs et jeunes pousses peuvent être exposées à des températures négatives. Cela peut conduire à des dégâts de gel, ainsi que l'apparition de certaines maladies comme par exemple la bactériose des arbres fruitiers causée par *Pseudomonas syringae*, qui est favorisée par l'alternance de phases de gel et de dégel (Klement *et al.*, 1984; Vigouroux, 1999).

Les paillages naturels dits « vivants » sont constitués d'espèces semées à la fin du printemps ou au début de l'été (Freyman, 1989; Zebarth *et al.*, 1993), et qui lorsqu'elles vont mourir, soit naturellement par l'action du gel, soit par l'action d'un travail mécanique de l'arboriculteur, vont former une couche végétale qui va empêcher la germination d'autres plantes herbacées (Freyman, 1989). Ces paillages « vivants » peuvent être considérés comme des couvre-sols annuels. Les espèces les plus utilisées dans ce cas de figure sont *Hordeum vulgare*, *Lolium multiflorum*, *Sinapis alba* et *Trifolium subterraneum* (Mantinger and Gasser, 1987; Enache and Ilnicki, 1990). Il est également possible d'utiliser des espèces ayant une croissance tardive débutant à l'automne et qui vont dépérir naturellement au printemps de l'année suivante. Il s'agit d'espèces telles que *Lamium purpureum*, *Poa annua*, *Stellaria media* et *Trifolium subterraneum* (Mantinger and Gasser, 1987; Enache and Ilnicki, 1990; Stasiak, 1990). Une autre technique est la mise en place d'un couvert végétal constitué d'une ou plusieurs espèces herbacées puis sa destruction ciblée par l'action d'herbicides foliaires tels que le glyphosate

(N-[phosphono-methyl]glycine) (Sarrantoni and Scott, 1988; Raimbault *et al.*, 1990; Reeves *et al.*, 1993; Bauer and Reeves, 1999), ou de mixtures d'herbicides de pré- et post-émergence non sélectifs (Teasdale and Shirley, 1998).

Le couvert végétal une fois mort peut être laissé tel quel à la surface ou bien être intégré dans le sol par un travail mécanique. Il s'agit d'une méthode très souvent utilisée avant la plantation des arbres sur les futurs rangs afin de stimuler l'activité microbienne et augmenter la teneur en matière organique du sol (Glenn and Welker, 1989, 1991). Pour obtenir un effet positif de ces paillages, c'est-à-dire diminuer le taux de germination des graines du sol et limiter la croissance des plantes herbacées, il faut un recouvrement minimum du sol d'environ 600 g m<sup>-2</sup> (Teasdale and Mohler, 1993). Généralement, selon le type de paillage, cela correspond à une épaisseur minimum d'une dizaine de cm, et compte tenu de leur dégradation rapide il faut procéder à un renouvellement annuel des paillages (Lanini *et al.*, 2011).

Les paillages naturels « morts » sont à base de pailles, provenant de la tonte de différentes espèces végétales (Engel, 1992; Lindhard, 1992), de sciures, copeaux ou écorces de différentes espèces ligneuses (Mantinger and Gasser, 1987; Niggli *et al.*, 1989; Lindhard, 1992; Spring, 1993). Ces paillages limitent la croissance des plantes herbacées adventices (Himmelsbach, 1992; Granatstein and Mullinix, 2008; Ingels *et al.*, 2013), mais peuvent également selon la nature du paillage apporter d'autres bénéfices aux vergers. Par exemple, l'utilisation d'un paillage à base de luzerne, ou alfalfa (*Medicago sativa*), peut augmenter le taux d'azote disponible dans le sol (Granatstein and Mullinix, 2008), alors que l'utilisation de paillages à base de certaines sciures et de tourbe de sphaigne peut faire diminuer le pH du sol (Karp *et al.*, 2004). D'autres paillages à base de composts (Brown and Tworkoski, 2004), papiers déchiquetés, ou encore de déchets à base de coton peuvent être utilisés pour contrôler l'enherbement des vergers (Warnick *et al.*, 2006; Granatstein and Mullinix, 2008). Cependant,



comme pour les paillages « vivants », ils doivent être appliqués sur une hauteur et largeur suffisantes pour être efficaces (Niggli *et al.*, 1989; Pfammatter, 1994; Lanini *et al.*, 2011), ce qui peut engendrer des coûts élevés selon le type de paillage employé (Pfammatter, 1994). Les paillages synthétiques quant à eux sont généralement à base de polyéthylène (Spring, 1993; Thakur *et al.*, 1993; Pfammatter, 1994) et de polypropylène (Mantinger and Gasser, 1987; Merwin *et al.*, 1995). Leurs propriétés sont similaires aux paillages naturels, ils sont cependant plus chers et difficiles à mettre en place, doivent généralement être renouvelés chaque année en raison de leur dégradation, et engendrent l'accumulation de déchets non recyclables dans les vergers (Hogue and Neilsen, 1987; Merwin *et al.*, 1995; Hostetler *et al.*, 2007a, b). Leur usage peut se justifier dans le cas de vergers exposés à des conditions environnementales défavorables à l'utilisation des autres techniques (Hegazi, 2000; Coventry *et al.*, 2005).

## **I.2. Gestion de l'enherbement, amélioration de la qualité du sol, de la santé des arbres et protection intégrée des cultures par utilisation de couvre-sols végétaux**

### **I.2.1. Mise en place des couvre-sols et choix des espèces végétales**

La mise en place d'un couvre-sol, soit uniquement sur les inter-rangs ou rangs, soit sur l'intégralité de la surface du verger, peut se faire de deux manières : la première consiste à laisser pousser les espèces végétales qui apparaissent de façon spontanée via la germination de graines déjà présentes dans le sol ou apportées par la végétation des alentours du verger,

**Tableau 1. Liste de la majeure partie des espèces utilisées comme plantes couvre-sol dans le monde (1/2).** Tableau compilé en utilisant les données issues des travaux de Freyman (1989), Glenn and Welker (1989), Kruger and Kuck (1990), Anderson *et al.* (1992), Hornig and Bunemann (1992), Mantinger and Gasser (1993), Sicher *et al.* (1993), Spring (1993), Thakur *et al.* (1993), Pfammatter (1994), Breil (1999), McGourty (2004), Fageria *et al.* (2005), et d'Olmstead (2006).

Genre	Espèce	Famille	Nom vernaculaire (na = absence de données)
<i>Agrostis</i>	<i>capillaris</i>	Poaceae	Agrostis commun
<i>Astragalus</i>	<i>sinicus</i>	Fabaceae	Astragale de Chine
<i>Avena</i>	<i>sativa</i>	Poaceae	Avoine byzantine
<i>Brassica</i>	<i>juncea</i>	Brassicaceae	Moutarde brune
<i>Bromus</i>	<i>hordeaceus</i>	Poaceae	Brome mou
<i>Bromus</i>	<i>inermis</i>	Poaceae	Brome inerme
<i>Canavalia</i>	<i>ensiformis</i>	Fabaceae	Pois sabre blanc
<i>Crotalaria</i>	<i>breviflora</i>	Fabaceae	na
<i>Crotalaria</i>	<i>juncea</i>	Fabaceae	Crotalaire effilée
<i>Crotalaria</i>	<i>striata</i>	Fabaceae	na
<i>Cyamopsis</i>	<i>tetragonoloba</i>	Fabaceae	Cyamopse à quatre ailes
<i>Dactylis</i>	<i>glomerata</i>	Poaceae	Dactyle aggloméré
<i>Desmodium</i>	<i>ovalifolium</i>	Fabaceae	na
<i>Festuca</i>	<i>arundinacea</i>	Poaceae	Fétuque élevée
<i>Festuca</i>	<i>longifolia</i>	Poaceae	Fétuque à feuilles longues
<i>Festuca</i>	<i>ovina</i>	Poaceae	Fétuque ovine
<i>Festuca</i>	<i>pratensis</i>	Poaceae	Fétuque des prés
<i>Festuca</i>	<i>rubra</i>	Poaceae	Fétuque rouge
<i>Glechoma</i>	<i>hederacea</i>	Lamiaceae	Lierre terrestre
<i>Glycine</i>	<i>max</i>	Fabaceae	Soja
<i>Hordeum</i>	<i>brachiantherum</i>	Poaceae	na
<i>Hordeum</i>	<i>vulgare</i>	Poaceae	Orge commune
<i>Indigofera</i>	<i>tinctoria</i>	Fabaceae	Indigotier
<i>Lablab</i>	<i>purpureus</i>	Fabaceae	Lablab
<i>Lens</i>	<i>culinaris</i>	Fabaceae	Lentille
<i>Leucaena</i>	<i>leucocephala</i>	Fabaceae	Faux mimosa
<i>Lolium</i>	<i>multiflorum</i>	Poaceae	Ray-grass d'Italie
<i>Lolium</i>	<i>perenne</i>	Poaceae	Ray-grass anglais
<i>Lupinus</i>	<i>albus</i>	Fabaceae	Lupin blanc
<i>Medicago</i>	<i>lupulina</i>	Fabaceae	Luzerne lupuline
<i>Medicago</i>	<i>polymorpha</i>	Fabaceae	Luzerne polymorphe
<i>Medicago</i>	<i>sativa</i>	Fabaceae	Alfalfa
<i>Medicago</i>	<i>truncatula</i>	Fabaceae	Luzerne tronquée
<i>Melilotus</i>	<i>officinalis</i>	Fabaceae	Mélicot jaune

la seconde consiste à semer une espèce ou un mélange d'espèces, appartenant majoritairement aux Poaceae et Fabaceae (Guerra and Steenwerth, 2012).

Dans le premier cas de figure, les tontes répétées permettent de limiter l'installation des espèces envahissantes à croissance rapide, telles que les dicotylédones à feuilles larges, et favorisent la mise en place progressive d'une communauté végétale diversifiée renfermant des espèces particulièrement adaptées à la conduite culturale en verger (Lipecki and Berbec, 1997). Il s'agit par exemple d'espèces telles que *Lolium perenne*, *Poa annua*, *Agropyron repens*, *Taraxacum officinale*, *Stellaria media*, ainsi que *Trifolium repens* (Sicher *et al.*, 1993; Lipecki and Berbec, 1997).

Dans le cas d'utilisation de semences, les espèces utilisées dans les vergers et autres systèmes agricoles pérennes aux pratiques culturales très proches, tels que les vignobles, sont sélectionnées pour leur faible consommation d'eau, leur capacité à croître à l'ombre, leurs effets bénéfiques sur les teneurs en matières organiques et minérales du sol, leur résistance aux différentes conditions climatiques auxquels sont soumis les vergers, et leur tolérance au passage des machines agricoles. Dans les vergers de régions tempérées, les espèces fréquemment utilisées sont par exemple *Lolium perenne* (Freyman, 1989; Anderson *et al.*, 1992), *Festuca rubra* et *Festuca ovina* (Freyman, 1989; Anderson *et al.*, 1992), *Festuca arundinacea* (Glenn and Welker, 1989; Sicher *et al.*, 1993), *Poa compressa* (Spring, 1993; Pfammatter, 1994), *Poa pratensis* (Pfammatter, 1994), *Muhlenbergia schreberi* (Meyer *et al.*, 1992), et *Trifolium repens* (Thakur *et al.*, 1993).

Les plantes couvre-sol sont également utilisées en dehors des systèmes agricoles pérennes. Dans les cultures annuelles, les plantes couvre-sol sont alors en général semées en fin de saison afin d'améliorer la structure et régénérer les sols pour l'année suivante. Ces couvre-sols annuels, ou paillages « vivants » ont été décrits précédemment. Le Tableau 1 résume la

**Tableau 1. Liste de la majeure partie des espèces utilisées comme plantes couvre-sol dans le monde (2/2).** Tableau compilé en utilisant les données issues des travaux de Freyman (1989), Glenn and Welker (1989), Kruger and Kuck (1990), Anderson *et al.* (1992), Hornig and Bunemann (1992), Mantinger and Gasser (1993), Sicher *et al.* (1993), Spring (1993), Thakur *et al.* (1993), Pfammatter (1994), Breil (1999), McGourty (2004), Fageria *et al.* (2005), et d'Olmstead (2006).

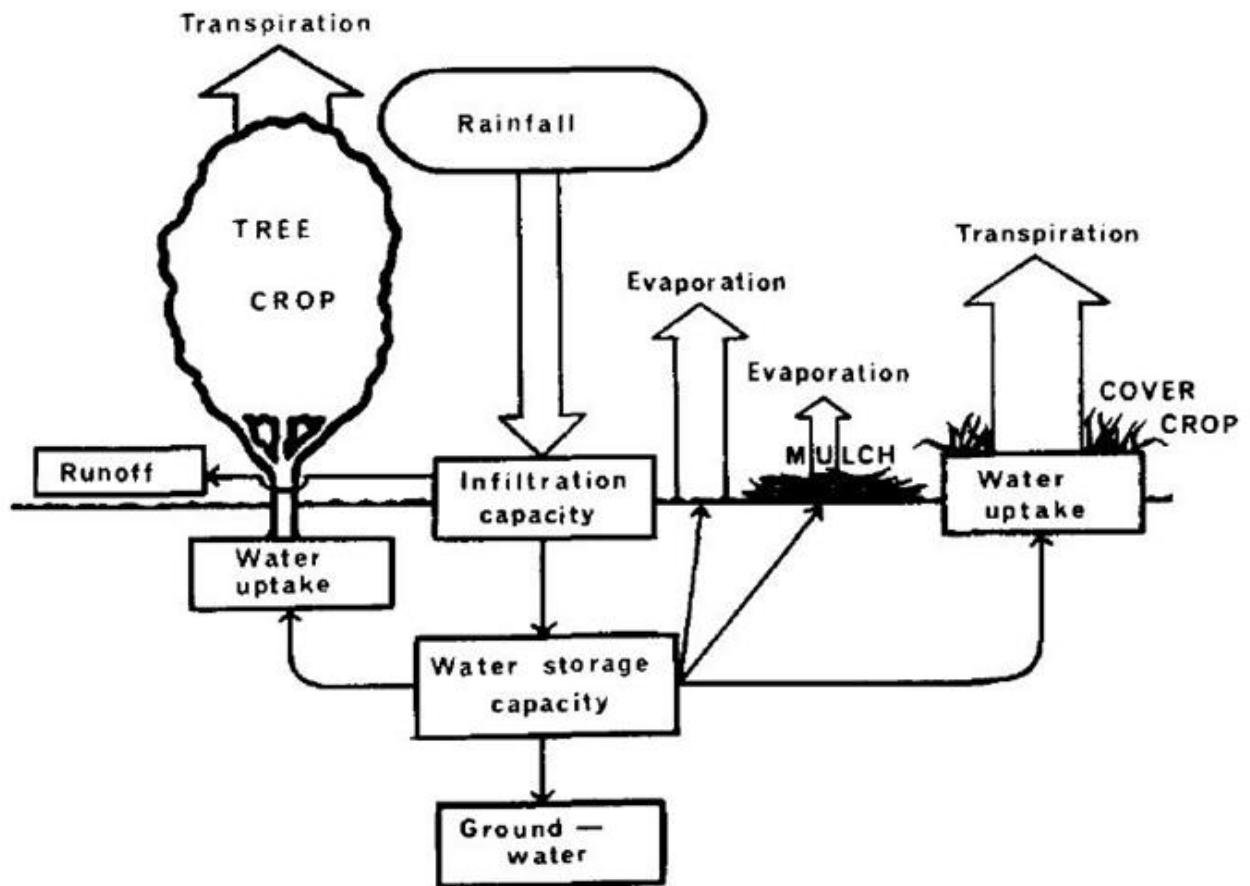
Genre	Espèce	Famille	Nom vernaculaire (na = absence de données)
<i>Mucuna</i>	<i>aterrima</i>	Fabaceae	na
<i>Mucuna</i>	<i>cinereum</i>	Fabaceae	na
<i>Mucuna</i>	<i>deeringiana</i>	Fabaceae	Pois mascate
<i>Muhlenbergia</i>	<i>schreberi</i>	Poaceae	Muhlenbergia de Schreber
<i>Oryzopsis</i>	<i>hymenoides</i>	Poaceae	na
<i>Pisum</i>	<i>sativum</i>	Fabaceae	Pois cultivé
<i>Poa</i>	<i>compressa</i>	Poaceae	Pâturin à tiges aplaties
<i>Poa</i>	<i>pratensis</i>	Poaceae	Pâturin des prés
<i>Poa</i>	<i>trivialis</i>	Poaceae	Pâturin commun
<i>Potentilla</i>	<i>reptans</i>	Rosaceae	Potentille rampante
<i>Pueraria</i>	<i>phaseoloides</i>	Fabaceae	na
<i>Secale</i>	<i>cereale</i>	Poaceae	Seigle
<i>Sesbania</i>	<i>aculeata</i>	Fabaceae	Sesbania bispinosa
<i>Sesbania</i>	<i>rostrata</i>	Fabaceae	na
<i>Stylosanthes</i>	<i>guianensis</i>	Fabaceae	Luzerne brésilienne
<i>Trifolium</i>	<i>alexandrinum</i>	Fabaceae	Trèfle d'Alexandrie
<i>Trifolium</i>	<i>fragiferum</i>	Fabaceae	Trèfle fraisier
<i>Trifolium</i>	<i>hirtum</i>	Fabaceae	Trèfle hérissé
<i>Trifolium</i>	<i>incarnatum</i>	Fabaceae	Trèfle incarnat
<i>Trifolium</i>	<i>medic</i>	Fabaceae	na
<i>Trifolium</i>	<i>michelianum</i>	Fabaceae	Trèfle de Micheli
<i>Trifolium</i>	<i>pratense</i>	Fabaceae	Trèfle des prés
<i>Trifolium</i>	<i>repens</i>	Fabaceae	Trèfle blanc
<i>Trifolium</i>	<i>resupinatum</i>	Fabaceae	Trèfle de Perse
<i>Trifolium</i>	<i>subterraneum</i>	Fabaceae	Trèfle souterrain
<i>Triticum</i>	<i>aestivum</i>	Poaceae	Froment
<i>Vicia</i>	<i>angustifolia</i>	Fabaceae	Vesce à feuilles étroites
<i>Vicia</i>	<i>benghalensis</i>	Fabaceae	Vesce du Bengale
<i>Vicia</i>	<i>sativa</i>	Fabaceae	Vesce commune
<i>Vicia</i>	<i>villosa</i>	Fabaceae	Vesce velue
<i>Vigna</i>	<i>angularis</i>	Fabaceae	Haricot azuki
<i>Vigna</i>	<i>radiata</i>	Fabaceae	Haricot mungo
<i>Vigna</i>	<i>unquiculata</i>	Fabaceae	na
<i>Vulpia</i>	<i>myuros</i>	Poaceae	Vulpie queue-de-rat
<i>Zornia</i>	<i>latifolia</i>	Fabaceae	Maconha Brava

majeure partie des espèces végétales utilisées comme plantes couvre-sol dans les systèmes agricoles pérennes et annuels dans le monde.

### **1.2.2. Effets généraux de la présence d'un couvert végétal dans les vergers**

Comme pour les méthodes précédentes, les couvre-sols végétaux sont eux aussi utilisés pour contrôler la germination et la croissance des espèces végétales considérées comme nuisibles pour les cultures (Derpsch, 1990; Creamer *et al.*, 1996; Creamer and Baldwin, 2000).

Initialement considérés comme nuisibles pour les arbres (Bedford and Pickering, 1919), il a ensuite été démontré que la vigueur des arbres était inversement corrélée à celle des couvre-sols, d'où l'importance du choix des espèces lors de sa mise en place (Haynes, 1980). Effectivement, les arbres de vergers enherbés vont être généralement plus petits et moins vigoureux que ceux de vergers à sol nu (Bollard, 1957; Bould *et al.*, 1972; Goode and Hyrycz, 1976; Stott, 1976). Cette différence s'explique par la compétition pour les ressources, essentiellement la nutrition azotée et l'eau, entre les plantes du couvre-sol et les arbres (Bollard, 1957; Goode and Hyrycz, 1976; Glenn and Welker, 1989; Anderson *et al.*, 1992). Cependant, il a été démontré qu'au bout d'une dizaine d'années les arbres des vergers avec et sans couvre-sols végétaux présentent des tailles similaires (Fisher *et al.*, 1961), et que sur le long terme les couvre-sols végétaux permettent un meilleur stockage de l'eau, notamment en diminuant les pertes par ruissellement (Kenworthy, 1953; Haynes, 1980). Ils participent également à la diminution du lessivage des nutriments et des substances chimiques (Hall *et al.*, 1984; Danso and Curbelo, 1991; Ruttimann, 2001)(Figure 3). De plus l'utilisation de couvre-sols végétaux dans des vergers dont les sols sont régulièrement saturés en eau, tels que les sols argileux, peut réduire la mortalité des arbres par asphyxie et dégâts de gel par absorption



**Figure 3. Voies principales des mouvements d'eau au sein des vergers.** Représentation des mouvements d'eau dans des vergers dont les sols sont enherbés, désherbés, ou recouverts de paillages, et disponibilité de l'eau pour les arbres. Figure extraite de Haynes (1980).

d'une grande partie de ce surplus d'eau (Haynes, 1980). Paradoxalement contrairement à ce que l'on pourrait penser, la compétition pour l'eau dans les vergers enherbés permet l'obtention de fruits de meilleure qualité. Les fruits sont généralement plus petits, plus colorés, plus sucrés, renferment plus de matière sèche, et peuvent être conservés plus longtemps que ceux provenant d'arbres de vergers non enherbés (Stott, 1976; Hornig and Bunemann, 1992; Meheriuk *et al.*, 1992; Baugher *et al.*, 1995).

L'absence de travail mécanique, responsable de la destruction systématique des racines présentes dans les 10 à 20 premiers cm du sol, favorise également un meilleur développement du système racinaire des arbres (Coker, 1959). Effectivement, les racines vont pouvoir exploiter un volume plus important du sol, et développer un important réseau de fines ramifications à proximité de la surface pouvant atteindre jusqu'à 2 cm de racine par cm<sup>3</sup> de sol (Cockroft and Wallbrink, 1966; Haynes, 1980). Selon les espèces végétales couvre-sol utilisées, un effet antagoniste entre les plantes couvre-sol et les arbres fruitiers semblerait exister, limitant la croissance verticale et la colonisation des parties superficielles du sol par les racines des arbres (Bedford and Pickering, 1919; Kacarava, 1961; Haynes, 1980). La présence d'un couvre-sol végétal favorise l'activité des vers de terre et modifie la structure et la taille des agrégats du sol via son système racinaire (Satchell, 1967; Russell, 1971; Allison, 1973; Tisdall, 1978). De plus, les mucigels racinaires, ainsi que les gommés polysaccharidiques produites par les populations bactériennes de la rhizosphère participent à la stabilisation des sols et diminuent ainsi les problèmes d'érosion fréquemment rencontrés dans les vergers à sol nu (Russell, 1915; Haynes, 1980; Langdale and Leonard, 1983; Hall *et al.*, 1984; Hartwig, 1988). Les plantes couvre-sol ont également une influence sur la composition des communautés microbiennes du sol via les exsudats racinaires. De nombreuses études ont démontrées que la composition des communautés microbiennes du sol est fonction des

espèces de plantes couvre-sol utilisées (Vukicevich *et al.* 2016). Globalement, (i) l'augmentation de la diversité des espèces de plantes couvre-sol augmente la diversité des communautés microbiennes du sol et réduit le risque de prolifération de populations de microorganismes pathogènes, (ii) l'augmentation de la diversité fonctionnelle des plantes couvre-sol augmente l'abondance des microorganismes bénéfiques pour la santé des plantes, (iii) les plantes couvre-sol de la famille des Brassicaceae permettent une réduction de l'abondance des pathogènes fongiques et promeuvent des espèces bactériennes antagonistes de diverses espèces pathogènes, (iv) les plantes natives favorisent et permettent une installation plus rapide de communautés microbiennes bénéfiques comparées à l'usage de plantes couvre-sol non natives ou exotiques, et enfin (v) le travail mécanique du sol, ainsi que l'usage de pesticides, perturbe les communautés microbiennes et peut dans certaines circonstances promouvoir la multiplication et l'installation de microorganismes pathogènes. Cependant, actuellement l'usage des plantes couvre-sol à des fins de gestion des communautés microbiennes du sol reste inexploité (Vukicevich *et al.* 2016).

Pour finir sur les effets généraux liés à l'usage de couvre-sols végétaux, tout comme les paillages, ceux-ci vont permettre l'isolation thermique du sol, réduire la profondeur de pénétration du gel et ainsi protéger les racines lors des périodes de grand froid (Blasse, 1961; Will, 1962; Cooper, 1973). Cependant, il faut savoir que la présence de couvre-sols végétaux hauts va diminuer de façon significative la température des masses d'air présentes au-dessus de ceux-ci comparée à celle des masses d'air au-dessus de sols nus (Haynes, 1980). Cela peut être préjudiciable en hiver, en revanche en été cette caractéristique peut être utilisée pour diminuer la température au niveau de la canopée des arbres (Proebsting, 1970).



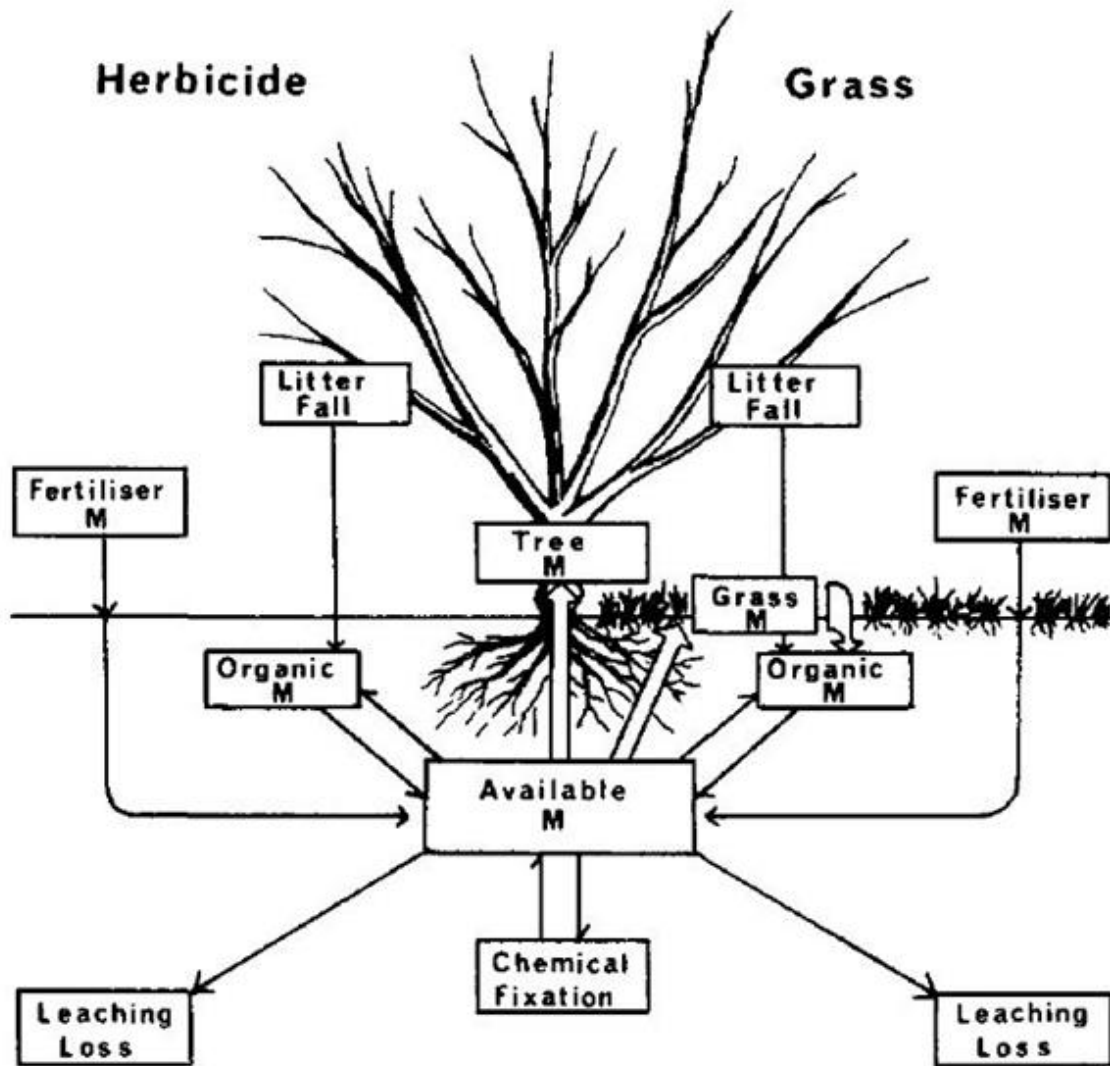


Figure 4. Représentation schématique des transformations majeures d'un élément nutritif M et de sa disponibilité pour les arbres. Deux cas de figure : celui d'un verger désherbé par herbicides (Herbicide), et celui d'un verger enherbé (Grass). Figure extraite de Haynes (1980).

### I.2.3. Contribution des couvre-sols végétaux à la nutrition azotée

Dans les vergers enherbés, le taux de matière organique est plus élevé dans les couches superficielles et diminue progressivement avec la profondeur. Ce gradient vertical est maintenu par l'apport continu de matière organique provenant des plantes couvre-sol et des arbres (Greenland, 1971; Campbell, 1978), ainsi que via les amendements apportés par les arboriculteurs (engrais, composts, etc.) (Figure 4). La minéralisation de la matière organique est généralement mesurée par la minéralisation des composés azotés. L'ammonification est responsable de la libération d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), forme préférentiellement assimilée par les microorganismes, qui est par la suite transformé en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), puis en nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), forme préférentiellement assimilée par les végétaux, lors de la nitrification. La gestion de la couverture du sol a un impact sur les processus de minéralisation de la matière organique et la teneur en azote minéral (Stevenson and Chase, 1953; Sanchez *et al.*, 2007) qui est généralement meilleure dans les sols enherbés du fait de l'apport continu de matière organique (Greenland, 1971). Cependant, en parallèle de cette minéralisation, on observe une conversion permanente de ces composés inorganiques en composés organiques par divers microorganismes autotrophes. De plus, une partie de l'azote minéral est perdue par lessivage et par production de composés volatils lors de la dénitrification, et une autre partie de l'azote minéral du sol est consommée par les plantes couvre-sol et n'est donc plus disponible pour les arbres. Ainsi, habituellement dans les vergers dont les couvre-sols sont constitués uniquement d'espèces herbacées la teneur en azote des arbres est plus faible comparée à celle des arbres de vergers à sol nu (Bould *et al.*, 1949; Bould and Ingram, 1974; Perring, 1975). Cependant, en cas d'incorporation de plantes légumineuses dans les couvre-sols, la teneur en azote des arbres est similaire, voir supérieure à celle des arbres cultivés sur sol nu (Bould and

Jarrett, 1962). Effectivement, les légumineuses permettent la fixation de l'azote atmosphérique grâce à leur association symbiotique avec des bactéries appartenant au genre *Rhizobium*. Selon l'espèce de plante légumineuse utilisée, le type de sol et les conditions climatiques, la fixation d'azote atmosphérique peut aller de 50 à 330 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> (Ingels, 1998; Guerra and Steenwerth, 2012). La minéralisation de la matière organique issue de la décomposition de ces légumineuses va permettre de régénérer et augmenter le stock d'azote minéral du sol grâce à l'azote atmosphérique obtenu par fixation biologique. La quantité et la vitesse de libération de l'azote minéral est fonction du ratio C:N, des conditions environnementales et de la quantité de matière sèche produite par les plantes couvre-sol (Fribourg and Johnson, 1955; Holderbaum *et al.*, 1990; Kuo and Sainju, 1998; Kuo and Jellum, 2000). Les légumineuses en raison de leur faible ratio C:N se décomposent très rapidement, alors que les plantes herbacées possèdent quant à elles généralement des ratios C:N élevés, ce qui entraîne une décomposition plus lente (Kuo and Sainju, 1998; Baggs *et al.*, 2000; McGourty and Reganold, 2005; Fourie *et al.*, 2006). Parmi les plantes légumineuses, celles qui produisent le plus de matière sèche, et qui contribuent donc le plus à la régénération de la matière organique et des éléments minéraux des sols, sont généralement *Vicia villosa*, *Vicia grandiflora* et *Trifolium incarnatum* (Nelson, 1944; Frye *et al.*, 1988; Holderbaum *et al.*, 1990). *Vicia villosa* par exemple, produit entre 3.7 et 5.1 t ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> de matière sèche et apporte entre 130 à 209 kg ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> d'azote (Ebelhar *et al.*, 1984; Hargrove, 1986; Elliott *et al.*, 1987; Hoyt, 1987).

Concernant les retombées économiques de l'utilisation de plantes couvre-sol, les études concernent essentiellement les cultures céréalières et les couvre-sols annuels, ou paillages « vivants ». Généralement, l'incorporation de couvre-sols à base de plantes légumineuses est bénéfique pour les producteurs grâce à leur apport d'azote via la fixation biologique de l'azote

atmosphérique. Par exemple, dans le cadre de la production de céréales, la combinaison de *Vicia villosa* et de fertilisation azotée à raison de 100 kg ha<sup>-1</sup> durant l'hiver donne par la suite de meilleurs rendements pour un coût de fertilisation moins élevé, que la simple fertilisation azotée à raison de 150 kg ha<sup>-1</sup> (Frye *et al.*, 1985). Un résultat similaire est obtenu lors d'une étude plus longue menée sur une période de 5 années consécutives (Frye, 1986).

#### **1.2.4. Utilisation des couvre-sols végétaux comme outil de protection intégrée des cultures**

Depuis la fin du XX<sup>ème</sup> - début du XXI<sup>ème</sup> siècle, la prise de conscience des conséquences environnementales des méthodes agricoles conventionnelles a fait paraître de nombreux programmes destinés à réduire les quantités d'intrants chimiques (insecticides, herbicides, engrais, etc.), et évaluer les risques liés à leur utilisation. Dans les régions tempérées, les vergers font partie des systèmes culturaux utilisant le plus de pesticides. Effectivement, du fait de la pérennité des vergers les niveaux d'infestations par des espèces nuisibles ou phytopathogènes peuvent augmenter d'année en année et nécessiter l'utilisation répétée et croissante de pesticides (Simon *et al.*, 2010). Par exemple, en France les vergers représentent seulement 1 % de la surface cultivée pour plus de 20 % des ventes d'insecticides (Codron *et al.*, 2003). Certains systèmes, tels que les vergers de pommiers, subissent en moyenne plus de 36 traitements annuels compte tenu de leur susceptibilité aux divers ravageurs (Sauphanor *et al.*, 2009). L'usage intensif de pesticides réduit la biodiversité de la faune et de la flore des vergers, contamine l'environnement situé à proximité par dissémination aérienne (Krebs *et al.*, 1999), et a pour conséquences des effets néfastes sur la santé animale et humaine (Baldi *et al.*, 1998; Aubertot *et al.*, 2007). De nombreuses études témoignent des effets négatifs des pesticides sur les ennemis naturels de nombreuses espèces nuisibles des arbres fruitiers, tels

que diverses espèces d'arthropodes et de parasitoïdes (Prokopy *et al.*, 1996; Pekar, 1999; Epstein *et al.*, 2000). Cela a pour conséquence une augmentation de l'abondance des populations des espèces nuisibles, dont le seul moyen de contrôle reste l'usage de pesticides. Dans le cadre de l'agroécologie et de l'ingénierie écologique (Altieri, 1995; Mitsch, 2012), dont l'objectif est la conception d'écosystèmes durables et bénéfiques à la fois pour la société humaine et l'environnement naturel, une alternative à l'usage des pesticides est l'introduction de couvre-sols végétaux, ou la modification de la composition des communautés végétales déjà présentes. Il s'agit d'une méthode largement adoptée (Gray *et al.*, 2012), et l'une des plus utilisées pour gérer la biodiversité à l'échelle du paysage (Kolos and Banaszuk, 2013). L'incorporation de couvre-sols dans les vergers augmente la biodiversité, diversifie les ressources, et crée de nouvelles niches permettant l'installation prédateurs naturels généralistes, ou spécialistes, des espèces nuisibles (Bugg, 1991, 1992; Bugg and Waddington, 1994; Simon *et al.*, 2010). Par exemple, en Chine l'utilisation de couvre-sols à base de *Trifolium repens* dans les vergers de pêchers, augmente significativement le nombre d'arthropodes prédateurs généralistes face à celui de pucerons et de tordeuses orientales du pêcher (*Grapholita molesta*). Ainsi, en présence d'un couvre-sol à base de *T. repens* le ratio prédateurs-proies peut être augmenté de plus de 380 % comparé à celui d'un sol nu (Wan *et al.*, 2014).

Cependant, les couvre-sols sont également hôtes de nombreuses espèces nuisibles qui peuvent dans certaines circonstances migrer vers les arbres (Fye, 1980; McClure *et al.*, 1982; Meagher and Meyer, 1990b, a; Wyss, 1996; Brown, 2001). En revanche, cette migration du couvre-sol vers les arbres est généralement le résultat d'une mauvaise gestion de l'enherbement, dont les conséquences sont une réduction des ressources alternatives et la

diminution de l'abondance des espèces prédatrices (Van Emden and Williams, 1974; McClure *et al.*, 1982; Westigard *et al.*, 1990; Flexner *et al.*, 1991).

### **I.3. Les couvre-sols végétaux, réservoirs de microorganismes pathogènes**

Dans le cas d'émergences de maladies, qu'elles soient animales, humaines ou végétales, la gestion de leur propagation et leur contrôle réside dans l'identification des sources et réservoirs d'inoculum. Dans le cas des maladies des arbres fruitiers, deux principales sources potentielles peuvent être suspectées : (i) les arbres eux-mêmes, et (ii) les couvre-sols végétaux et diverses espèces adventices poussant à l'intérieur ou à proximité des vergers (Malvick and Moore, 1988). Le second cas de figure reste hypothétique compte tenu du manque d'information concernant les effets des couvre-sols végétaux sur la dynamique et la structure des populations des microorganismes associés aux arbres. Cependant, différentes études ont tout de même démontré l'implication des plantes couvre-sol et adventices dans le maintien et la propagation de maladies des cultures. Ces études sont relativement peu nombreuses car généralement la présence de pathogènes passe inaperçue en raison de l'absence de symptômes sur ces plantes. Les raisons pour lesquelles on n'observe que très rarement des symptômes sur les plantes couvre-sol et adventices peuvent être résumés en quatre points : (i) les espèces végétales couvre-sol et adventices des vergers et autres cultures, présentent une très grande variabilité génétique, augmentant ainsi la probabilité de la présence d'individus résistants, (ii) les couvre-sols végétaux sont généralement constitués d'un assemblage d'espèces, ce qui diminue la probabilité de contact et la transmission de l'agent pathogène entre individus d'une même espèce, (iii) la présence de plantes résistantes, qui est le résultat de la sélection naturelle qui s'est effectuée sur le long terme, et (iv) l'élimination

naturelle des plantes sensibles, et avec elles les souches pathogènes très agressives (Wisler and Norris, 2005).

Dans le cas des virus un très grand nombre de plantes adventices font office d'hôtes alternatifs et jouent un rôle majeur dans la réinfection des cultures d'année en année (Duffus, 1971; Thresh, 1981; Burdon and Leather, 1990; Sutic *et al.*, 1999). On peut citer l'exemple des begomovirus, qui avant les années 1960 étaient essentiellement responsables de la présence de symptômes sur quelques espèces herbacées tropicales et subtropicales d'Amérique (Rivera-Vargas *et al.*, 2002). L'introduction en Amérique de *Bemisia argentifolii*, aleurode à large gamme d'hôtes probablement originaire d'Inde, a été suivie par l'apparition de nouveaux begomovirus sur différentes espèces cultivées telles que la tomate, le piment et les cucurbitacées (Polston and Anderson, 1997). L'apparition de nouveaux begomovirus est le résultat du transfert de begomovirus de plantes herbacées sur les plantes cultivées par *B. argentifolii*, ainsi que des phénomènes de sélections de variants et recombinants adaptés aux différentes espèces cultivées.

Chez la tomate plusieurs pathogènes impliquent des plantes couvre-sol et adventices dans le développement de maladies. C'est le cas du virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV), du virus de la maladie bronzée de la tomate (tomato spotted wilt virus, TSWV), de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *P. syringae* pv. *tomato*, et autres *Pseudomonas* fluorescents (McCarter *et al.*, 1983; Jones *et al.*, 1986; Wisler *et al.*, 1998; Groves *et al.*, 2002; Momol *et al.*, 2002; Salati *et al.*, 2002; Momol *et al.*, 2003). Chez l'oignon, la bactérie responsable de la pourriture molle, *Pantoea ananatis*, a été isolée sur plus d'une vingtaine d'espèces herbacées associées aux cultures (Gitaitis *et al.*, 2002).

Dans les vergers, la présence d'un certain nombre de microorganismes pathogènes des arbres fruitiers sur les plantes couvre-sol et adventices a également été démontrée, c'est par

exemple le cas de *Xanthomonas campestris* (Kishun and Sohi, 1979; Morris and Knox-Davies, 1980; Schaad and Dianese, 1981; Kuan *et al.*, 1986; Toussaint *et al.*, 2012), *Xylella fastidiosa* (Shapland *et al.*, 2006), et de *P. syringae* (English and Davis, 1960; Davis and English, 1969; Ercolani *et al.*, 1974; Waissbluth and Latorre, 1978; Latorre and Jones, 1979a, b; Roos and Hattingh, 1986b; Baca and Moore, 1987b, a; Malvick and Moore, 1988; Mabagala and Saettler, 1992; Liu *et al.*, 2016).

Dans le cas de *P. syringae*, les populations des plantes couvre-sol et adventices des vergers et pépinières présentent des abondances de l'ordre de  $10^4$  à  $10^9$  CFU g<sup>-1</sup> de matière fraîche tout au long de l'année. Malvick et Moore (1988) ont démontré que la majorité des souches de *P. syringae* isolées à partir de plantes couvre-sol de vergers de poiriers et d'érables de l'Oregon était capable d'induire une réaction d'hypersensibilité lors de l'injection sur plants de tabac, ainsi que des symptômes lors de l'injection sur des plantules de poiriers et d'érables.

Compte tenu de l'abondance et de la présence permanente de *P. syringae* sur les couvre-sols végétaux, ceux-ci semblent jouer un rôle important dans l'épidémiologie de *P. syringae* chez les arbres fruitiers. Ces couvre-sols pourraient assurer la survie de populations de *P. syringae* pathogènes lors des périodes peu favorables à la vie épiphyte sur les arbres, et participer au rétablissement des populations épiphytes des arbres au retour des conditions favorables par inoculation via des particules aérosols, des projections de gouttes d'eau de pluie ou d'arrosage, ou par contact direct entre les arbres et les plantes couvre-sol. Le rôle de la composition des communautés végétales des couvre-sols sur l'abondance et la structure des populations de *P. syringae* qui y sont associées, ainsi que celles des arbres fruitiers, reste à déterminer. Il est possible que certaines espèces, ou assemblages d'espèces, végétales puissent moduler les populations de *P. syringae* qui y sont associées, soit (i) directement par exsudation de molécules aux propriétés antimicrobiennes dans leur environnement proche,

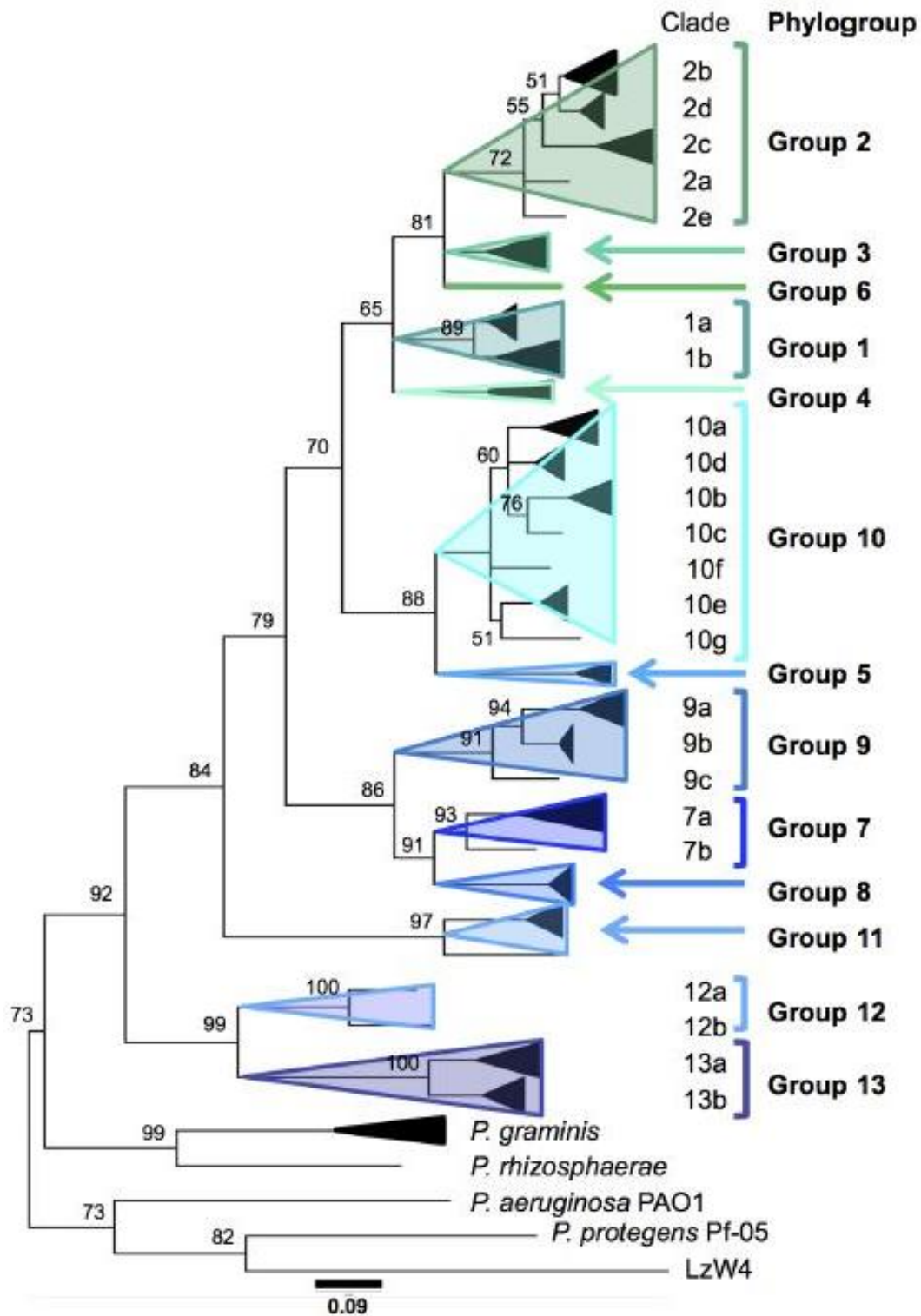


soit (ii) indirectement en modifiant la composition des communautés microbiennes, favorisant l'installation de microorganismes, ou de *P. syringae*, non pathogènes et antagonistes des *P. syringae* pathogènes des arbres fruitiers.

## II. *Pseudomonas syringae* : bactérie épiphyte, pathogène et glaçogène

*P. syringae* a été isolé pour la première fois à partir d'un lilas malade (*Syringa vulgaris* L.) par Beijerinck en 1899, puis caractérisé et nommé par van Hall en 1902 (Young, 1991). Il s'agit d'une bactérie, appartenant à la classe des  $\gamma$ -Proteobacteria, aérobie stricte, Gram-négative, en forme de bâtonnet de 0.7 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur et 0.7 à 1  $\mu\text{m}$  de largeur, et mobile grâce à la présence d'un à trois flagelles polaires. Les souches ne possèdent ni cytochrome oxydase, ni arginine dihydrolase. A part quelques exceptions, elles sont incapables d'induire la pourriture molle de la pomme de terre, sur le milieu B de King elles produisent un pigment fluorescent jaune verdâtre ou bleu selon les souches (King *et al.*, 1954), visible sous lumière ultra-violette (UV), et sont capables d'induire une réaction d'hypersensibilité lors d'injections dans les feuilles de plants de tabac (Hirano and Upper, 1990; Gaignard and Luisetti, 1993). Cette réaction d'hypersensibilité sur feuilles de plants de tabac est utilisée jusqu'à aujourd'hui en tant qu'outil de diagnostic de la pathogénicité. Cependant il semblerait que dans le cas de *P. syringae*, cet outil de diagnostic ne soit pas fiable (Latorre and Jones, 1979b).

Actuellement, des génomes complets et ébauches de génomes de plus d'une centaine de souches de *P. syringae* sont accessibles sur des bases de données publiques telles que NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et JGI (<http://jgi.doe.gov/>). Selon les souches, la taille des génomes disponibles varie entre 4.7 et 7.7 Mb, et ils renferment entre 4500 et 11000 gènes. La classification des souches de *P. syringae* a beaucoup évolué au cours des dernières années. Initialement cette classification était basée sur des critères phénotypiques (physiologiques et écologiques), puis ceux-ci ont progressivement été remplacés par la comparaison des génotypes via des techniques telles que l'hybridation ADN-ADN, ou bien le séquençage de différents gènes de ménage (Young, 2010). De plus les différentes souches de *P. syringae* ont



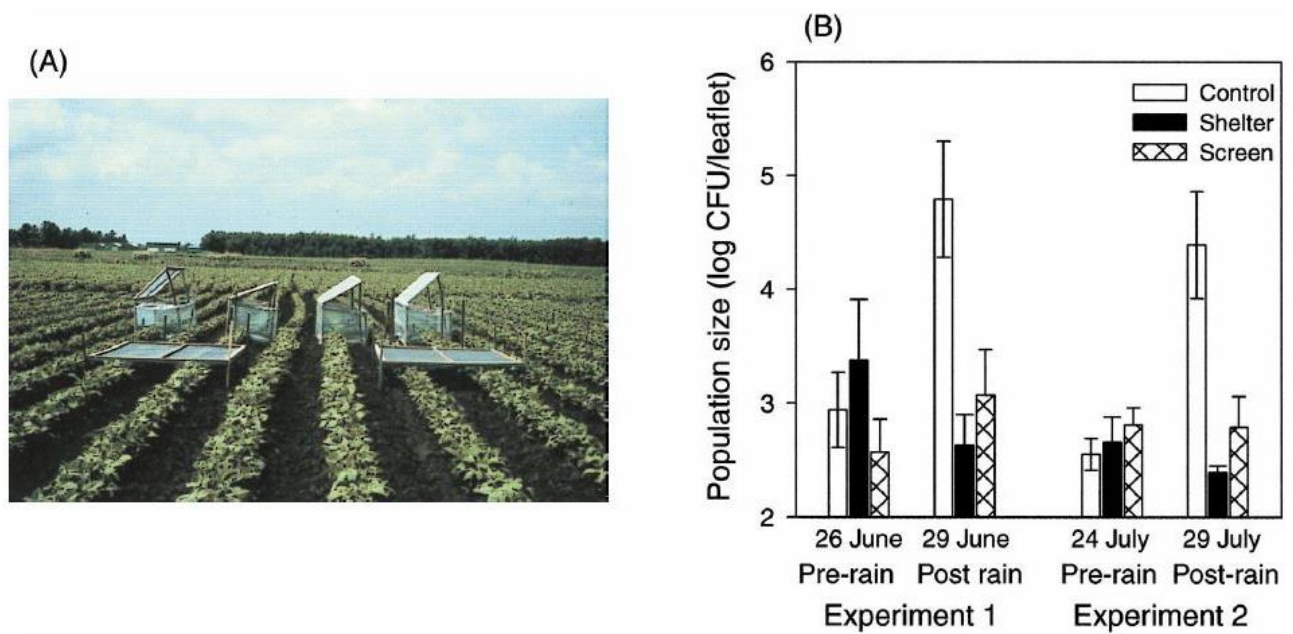
**Figure 5. Arbre phylogénétique du complexe *P. syringae*.** Arbre bayésien construit à partir des séquences concaténées des gènes *cts*, *gyrB*, *gapA* et *rpoD* de 216 souches de *P. syringae*. Les valeurs de bootstrap sont indiquées au niveau de chaque embranchement. La taxonomie des souches a été compressée, seuls les clades et groupes phylogénétiques sont indiqués. L'arbre a été enraciné par la souche *P. aeruginosa* PAO1. Figure extraite des travaux de Berge *et al.* (2014).

été classées en plus de 50 pathovars (pv.), distingués pour leur pouvoir pathogène différentiel (Young *et al.*, 1978; Dye *et al.*, 1980; Bradbury, 1986). Cependant, des variations intra-pathovars sont observées et certains initialement isolés et considérés comme pathogènes d'une seule plante ont vu leur gamme d'hôte s'élargir lors de tests de pouvoir pathogène plus exhaustifs (Gaignard and Luisetti, 1993). De plus, pour des souches de *P. syringae* isolées à partir de milieux aquatiques et terrestres, ainsi qu'à partir de plantes asymptomatiques, le concept de pathovar devient obsolète et perd tout son sens dans la description et la classification de celles-ci (Morris *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2010). Ainsi la classification basée sur des analyses génétiques est celle qui est désormais la mieux adaptée à la description des liens entre différentes souches de *P. syringae*. Lors de la comparaison des séquences de gènes de ménage, les souches de *P. syringae* ont d'abord été classées en sept groupes distincts, auxquels se sont rajoutées des espèces proches telles que *P. cichorii*, *P. viridiflava* et *P. avellanae* (Billing, 1970; Janse *et al.*, 1996; Gardan *et al.*, 1999; Bodilis and Barray, 2006; Mulet *et al.*, 2010; Bull *et al.*, 2011; Parkinson *et al.*, 2011; Scortichini *et al.*, 2013). Puis plus récemment, une étude basée sur la caractérisation génotypique et phénotypique de 763 souches de *P. syringae*, représentatives de la variabilité génétique d'une collection de plus de 1600 souches de *P. syringae*, a permis via des analyses phylogénétiques de quatre gènes de ménage (*cts*, *gpaA*, *gyrB*, et *rpoD*), l'identification de 23 clades répartis en 13 phylogroupes (Figure 5), incluant les sept phylogroupes décrits lors des études précédentes (Berge *et al.*, 2014). Certains phylogroupes représentent un intérêt particulier dans le cadre de l'épidémiologie de *P. syringae* compte tenu de la présence de nombreuses souches pathogènes, c'est le cas par exemple des phylogroupes 1, 2, 7 et 8. Effectivement, le phylogroupe 1 renferme de nombreuses souches de *P. syringae* pathogènes isolées à partir de plantes malades. On peut citer par exemples *P. syringae* pv. *tomato*, *P. avellanae*, *P.*

*syringae* pv. *actinidiae* (Psa), respectivement responsables de la moucheture bactérienne de la tomate, ainsi que du chancre bactérien du noisetier et du kiwi. Le phylogroupe 2, ubiquiste, renferme des souches de *P. syringae* isolées à partir de milieux terrestres, aquatiques, agricoles et naturels. On y trouve des souches telles que *P. syringae* pv. *syringae*, pathogène sur une très large gamme d'hôtes, ainsi que *P. syringae* pv. *aptata*, et *P. syringae* pv. *atrofaciens*, responsables de la bactériose du melon et du blé. Les phylogroupes 7 et 8 sont très proches génétiquement et renferment essentiellement des souches de *P. viridiflava*, pathogènes sur une large gamme d'hôte et se distinguent des autres *P. syringae* par leur capacité à induire la pourriture molle sur pomme de terre.

### **II.1. Mode de vie épiphyte de *P. syringae***

En 1959, Crosse révèle pour la première fois le mode de vie épiphyte de *P. syringae* (Crosse, 1959). Dans ses travaux *P. syringae* pv. *morsprunorum*, agent responsable du chancre et de tâches nécrotiques sur arbres fruitiers à noyaux, est isolé à plusieurs reprises à partir de feuilles et tiges de cerisiers asymptomatiques. Suite à cette découverte, d'autres études mettent à leur tour en évidence la présence épiphyte de *P. syringae* sur les feuilles, fruits et tiges de pêchers, d'amandiers, d'orangers, et de citronniers, ainsi que sur des plantes adventices présentes dans les vergers (English and Davis, 1960; Panagopoulos, 1966). Ces découvertes amènent à l'élaboration d'un nouveau concept, selon lequel les bactéries phytopathogènes possèderaient un stade de vie épiphyte au cours duquel elles se multiplieraient à la surface de plantes asymptomatiques, et lors de conditions environnementales favorables elles seraient à l'origine de l'émergence de maladies (Leben, 1965). Par la suite la présence épiphyte de *P. syringae* est établie sur un grand nombre

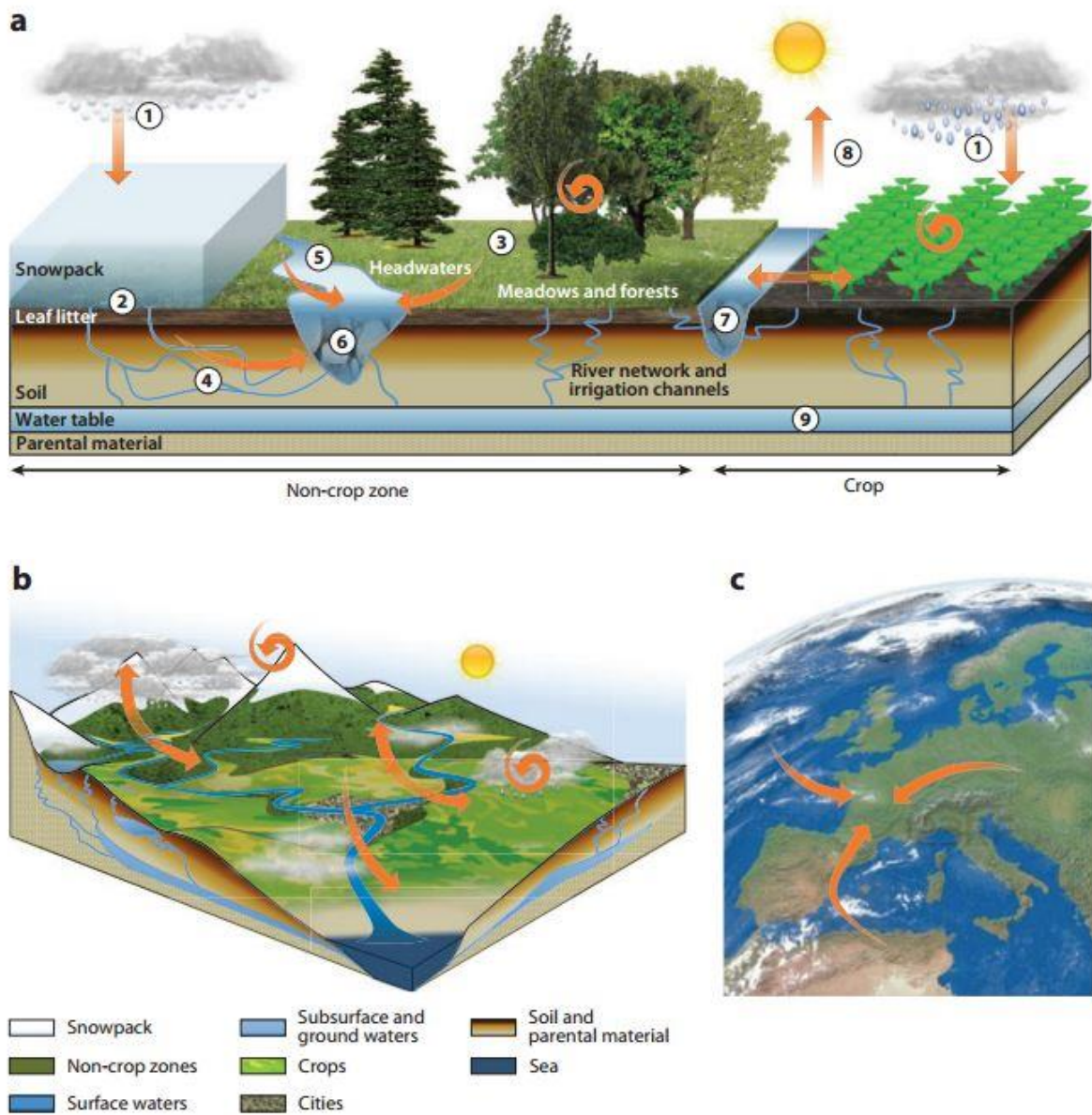


**Figure 6. Effet de l'impact des gouttes de pluies sur la taille des populations épiphytes de *P. syringae*.** Modification du microclimat à l'aide d'abris en polyéthylène et d'écran en fibre de verre (A). Les abris sont utilisés pour protéger les plants de haricots de la pluie, et les écrans en fibre de verre sont utilisés pour réduire l'impact des gouttes de pluie lorsqu'elles tombent sur les plants de haricots. Taille des populations de *P. syringae* sur plants de haricots exposés à la pluie (Control), protégés par des arbis (Shelter), et sous des écrans de fibre de verre (Screen) (B). Pour chaque date les abondances moyennes et erreurs standards sont données en log CFU, basées sur trois répétitions de 10 échantillons par traitement. Figure réimprimée par Hirano et Uppur (2000) à partir de Hirano *et al.* (1996).

d'espèces de plantes différentes (Gaignard and Luisetti, 1993). Il semblerait qu'au cours de son mode de vie épiphyte, *P. syringae* utilise les cavités stomatiques pour la multiplication cellulaire. Lorsque les conditions environnementales sont favorables, d'importantes quantités de cellules émergent de ces cavités et colonisent la surface des feuilles puis les autres organes (Young, 1978; Roos and Hattingh, 1983).

Parmi les facteurs environnementaux, la pluie est celui qui a le plus d'impact sur la dynamique des populations épiphytes de *P. syringae* (Hirano *et al.*, 1996). Lors d'épisodes pluvieux la taille des populations épiphytes de *P. syringae* diminue généralement d'un facteur 10 à 100 (Lindemann and Upper, 1985), puis augmente à nouveau dans les 24h suivantes (Hirano and Upper, 1989; Hirano *et al.*, 1996). Cette diminution de la taille des populations est très probablement le résultat du lessivage des bactéries épiphytes par l'eau de pluie (Lindemann and Upper, 1985; Constantinidou *et al.*, 1990; Hirano and Upper, 1991; Hirano *et al.*, 1994; Hirano *et al.*, 1995). L'eau apportée par la brume, la rosée, ou les systèmes d'arrosage, fournit également des conditions favorables aux populations épiphytes de *P. syringae* (Foulkes and Lloyd, 1980; Latorre *et al.*, 1985). Cependant, il a été montré que c'est l'impact des gouttes de pluie qui est le facteur déclenchant de la multiplication de *P. syringae*, pouvant aboutir à l'augmentation des populations d'un facteur 1000. Effectivement, lorsque les plantes sont protégées par un filet amortissant les gouttes, ou une bâche ne laissant pas passer la pluie, cette multiplication massive n'est pas observée (Hirano *et al.*, 1996)(Figure 6). De plus, compte tenu de l'association de l'histoire de vie de *P. syringae* au cycle de l'eau (Morris *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2010 ; Morris *et al.* 2013), la pluie représente également une source d'inoculum et de dispersion à grande échelle (Figure 7).

La disponibilité des nutriments est l'un des facteurs déterminants de la vie épiphyte. Des sucres simples, tels que le glucose, fructose, et le sucrose, sont libérés de façon naturelle à la

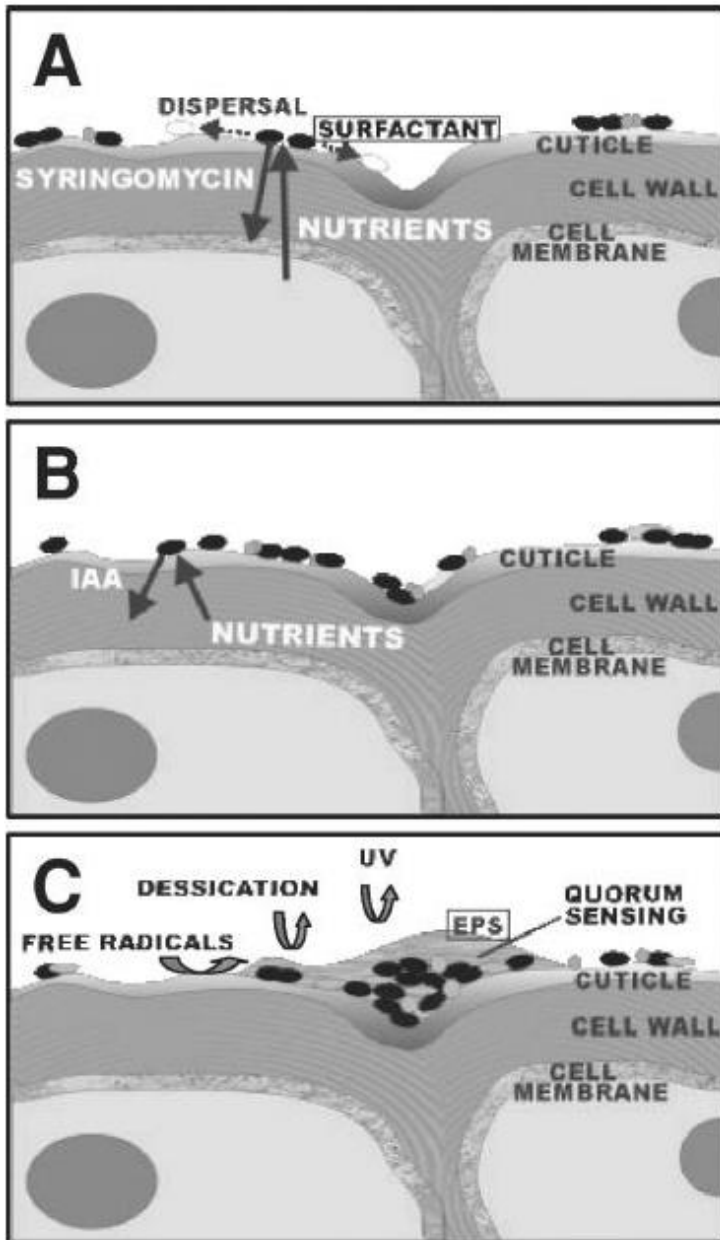


**Figure 7. Histoire de vie de *P. syringae* associée au cycle de l'eau.** Figure extraite de Morris *et al.* (2013).



surface des feuilles des végétaux et disponibles pour la croissance des microorganismes. Par exemple sur une feuille de haricot on peut avoir entre 0.2 à 10 µg de sucre, quantité suffisante pour assurer la croissance de  $10^7$  à  $10^8$  cellules microbiennes (Lindow and Brandl, 2003).

De plus, les microorganismes épiphytes doivent également s'adapter aux rayonnements UV auxquels ils sont soumis. Chez *P. syringae*, il a été démontré que la tolérance aux UV est associée à un gène plasmidique *ruIAB* induit par les UV, lui conférant la capacité de réparer son ADN (Sundin and Bender, 1996; Kim and Sundin, 2000, 2001; Sundin, 2002a; Sundin, 2002b). *P. syringae* est également capable de modifier son environnement en sécrétant diverses molécules agissant soit comme bouclier protecteur contre la dessiccation, les rayonnements UV, et les radicaux libres, soit comme bio-surfactants. La production de la toxine syringomycine est observée chez un très grand nombre de souches de *P. syringae*, y compris chez des souches non pathogènes. Celle-ci agit comme bio-surfactant, en favorisant l'humidification et en modifiant le fonctionnement des canaux ioniques présents à la surface des feuilles, aboutissant ainsi à l'exsudation de nutriments essentiels à la multiplication bactérienne (Quigley and Gross, 1994; Hutchison *et al.*, 1995). L'exsudation des nutriments peut également être stimulée par la synthèse de régulateurs de croissance tels que l'acide indole-3-acétique (IAA) (Lindow and Brandl, 2003). La production de polysaccharides extracellulaires (EPS), permet d'agrèger les cellules bactériennes et les protéger contre la dessiccation, les rayonnements UV, ainsi que les radicaux libres (Costerton *et al.*, 1995; Kiraly *et al.*, 1997). Chez *P. syringae* la synthèse d'alginate est stimulée par les stress hydriques, et la présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Singh *et al.*, 1992; Keith and Bender, 1999; Yu *et al.*, 1999). La cohésion et l'agrégation des bactéries au sein des biofilms d'EPS favorise le *quorum-sensing*, qui passe par la production de n-acyl homoserine lactone et est responsable du contrôle de l'expression de gènes densité-dépendants (Cha *et al.*, 1998; Dumenyo *et al.*, 1998; Pierson *et al.*, 1998)



**Figure 8. Représentation schématique des différentes modifications hypothétiques de la phyllosphère par les bactéries épiphytes.** Exsudation de nutriments par les cellules végétales et de la dispersion des cellules bactériennes sous l'effet de la syringomycine, agissant comme toxine et bio-surfactant (A), exsudation de saccharides par les cellules végétales sous l'effet d'auxines secrétées par les bactéries (B), et protection des populations bactériennes contre les rayonnements UV, la dessiccation et les radicaux libres par la production d'EPS (C). Figure extraite de Lindow and Brandl (2003).

(Figure 8). Et enfin, il a également été démontré que la capacité d'adhésion de *P. syringae* à la surface des plantes était associée à la présence d'un pilus (Hirano and Upper, 2000). Par exemple chez la tomate, des souches de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 mutantes, déficientes du pilus de type IV, n'arrivent pas à établir des populations aussi abondantes que celles des souches non mutantes (Roine *et al.*, 1998).

## **II.2. Pouvoir pathogène de *P. syringae***

Après colonisation des parties aériennes des arbres, *P. syringae* pénètre dans les espaces intercellulaires via les stomates, hydathodes et blessures. Une fois à l'intérieur *P. syringae* produit des EPS, des enzymes extracellulaires telles que des pectinases et cellulases, des phytotoxines comme par exemple la syringomycine, la mangotoxine, persicomycine, phaseolotoxine, syringopeptine, tabtoxine, tagetitoxine et la coronatine, des phytohormones telles que l'acide indole 3-acétique (AIA) et des cytokinines (CK), ainsi que des protéines effectrices (facteurs de virulence) qui sont sécrétées à l'intérieur des cellules des plantes hôtes via un système de sécrétion. Ces éléments provoquent l'imbibition d'eau et la concentration d'éléments nutritifs dans la zone infectée, dégradent les composants des parois cellulaires végétales, et modulent des fonctions biologiques et le système immunitaire des plantes (Gaignard and Luisetti, 1993; Bender *et al.*, 1999; Kennelly *et al.*, 2007).

Chez les plantes il existe deux types d'immunité. Le premier détecte la présence de pathogènes grâce à des récepteurs de reconnaissance transmembranaire (PRRs, pour transmembrane Pattern Recognition Receptors) spécifiques de certains motifs moléculaires faiblement évolutifs appelés MAMPs ou PAMPs pour Microbial/Pathogen-Associated Molecular Patterns, comme par exemple la flagelline. Il s'agit de l'immunité basale, également

appelée PTI pour PAMP Triggered Immunity. La seconde agit au niveau intracellulaire, en faisant intervenir des protéines NB-LRR (Nucleotide-Binding site plus Leucine-Rich Repeat), codées par les gènes de résistance R. Ici on parle d'ETI pour Effector Triggered Immunity. Elle est responsable de la réaction d'hypersensibilité (HR) qui correspond à la mort programmée des tissus infectés dans les 24h suivant l'arrivée du pathogène, efficace contre les pathogènes biotrophes et hémibiotrophes, c'est-à-dire qui se développent sur des hôtes vivants, mais pas contre les nécrotrophes. L'immunité basale peut être contournée par les pathogènes via la sécrétion d'effecteurs interférant avec ce système et aboutissant à une susceptibilité de la plante, aussi appelée ETS pour Effector-Triggered Susceptibility. Ces effecteurs peuvent être reconnus par les protéines NB-LRR aboutissant à une résistance des plantes face aux pathogènes, cependant grâce à la sélection naturelle, les pathogènes peuvent acquérir de nouveaux effecteurs permettant l'infection des plantes résistantes, jusqu'à ce que celles-ci acquièrent à leur tour de nouvelles protéines NB-LRR capables de reconnaître les nouveaux effecteurs (Dangl and Jones, 2001; Jones and Dangl, 2006).

Chez *P. syringae*, l'injection des effecteurs dans les cellules végétales se fait via un système de sécrétion de type III (T3SS, pour Type 3 Secretion System)(Jin *et al.*, 2003). Le T3SS est codé par les gènes *hrp*, initialement découverts chez *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Lindgren *et al.*, 1986). Les gènes *hrp*, pour hypersensitive reaction and pathogenicity, localisés dans des clusters d'environ 25 kb, sont nécessaires pour pouvoir induire la maladie chez les plantes hôtes et des réactions d'hypersensibilité chez des plantes non hôtes ou hôtes résistantes. Ils codent pour des protéines impliquées dans la régulation de transcriptions, des composants du système de sécrétion, ainsi que des protéines effectrices. Chez toutes les souches de *P. syringae*, le locus *hrp* est constitué de 27 ORFs (Open Reading Frames) organisés en six opérons. Au total on distingue trois classes de gènes : (i) des gènes codant pour les

composants de base du T3SS, incluant huit gènes *hrc* qui sont très conservés entre pathogènes animaux et végétaux, (ii) des gènes codant pour des protéines régulatrices (HrpL, HrpR, HrpS et HrpV) responsables de l'expression des gènes associés au T3SS, et enfin (iii) des gènes codant pour des protéines effectrices (Jin *et al.*, 2003). D'autres gènes codant pour des protéines effectrices putatives sont situés de part et d'autre du locus *hrp* (Alfano *et al.*, 2000). Chez *P. syringae*, les gènes *hrp* sont peu exprimés en dehors des plantes, cependant l'expression débute lors de l'arrivée dans l'apoplaste. L'expression des gènes va permettre la construction du système de sécrétion qui s'apparente à un flagelle. Ce système de sécrétion est constitué de deux parties, d'une base annulaire et d'une aiguille (Kubori *et al.*, 1998). Chez les pathogènes animaux cette aiguille fait environ 100 nm de longueur pour un diamètre d'environ 8 nm. Chez les bactéries phytopathogènes une telle aiguille n'a jamais été isolée, en revanche une structure similaire, plus longue de l'ordre de quelques micromètres, appelée pilus Hrp a été isolée chez *P. syringae* et de nombreuses autres bactéries phytopathogènes (Roine *et al.*, 1997; Van Gijsegem *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2001). La sous unité la plus importante de ce pilus Hrp est la protéine HrpA, puisque des *P. syringae* mutants de *hrpA* ne produisent plus le pilus Hrp, sont incapables d'induire la maladie chez la plante hôte, et n'élicitent plus de réponse d'hypersensibilité chez les plantes non hôtes (Roine *et al.*, 1997). Un inventaire complet de l'ensemble des effecteurs de *P. syringae* semble difficile à faire compte tenu de la grande variabilité génétique existante au sein de cette espèce, cependant l'étude du génome de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 a permis de mettre en évidence plus d'une trentaine de gènes codant pour des protéines effectrices (Guttman *et al.*, 2002; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002).

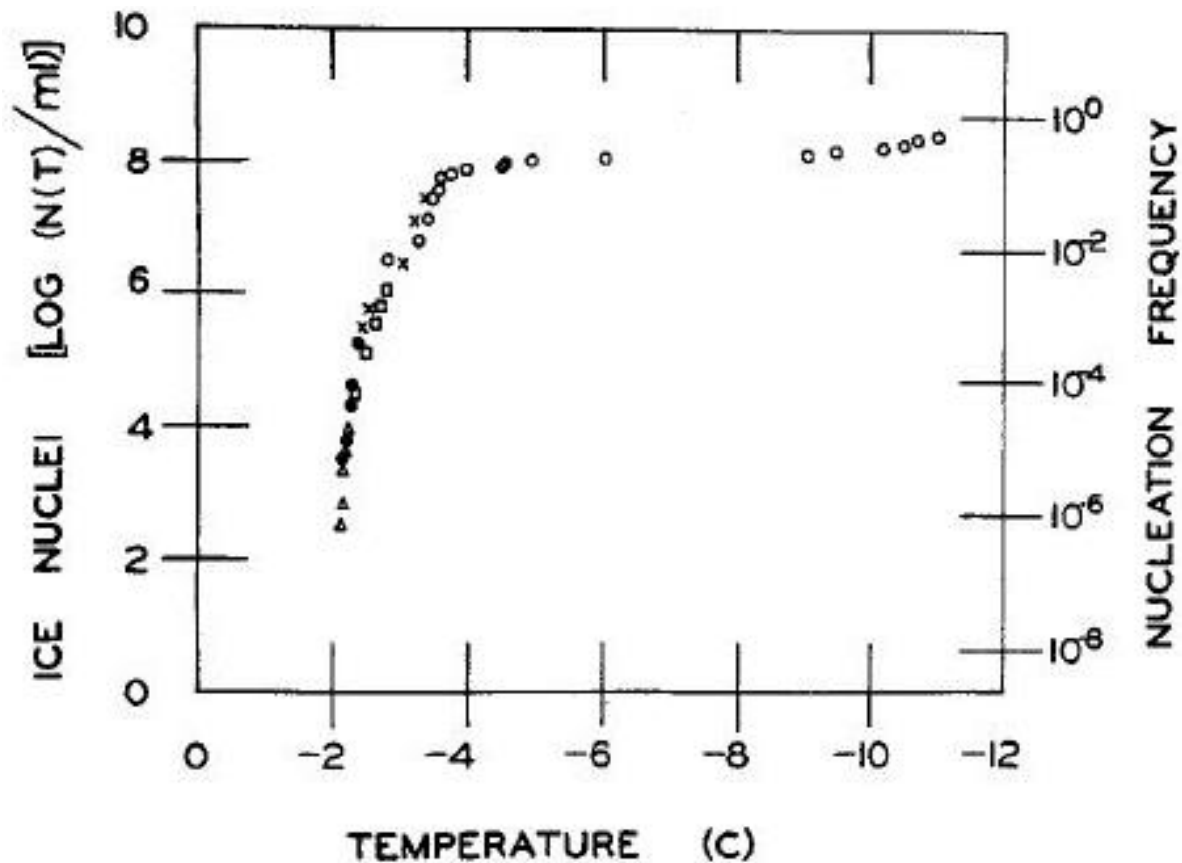
Concernant l'intervention de ces effecteurs dans la pathogénicité de *P. syringae* il y a deux possibilités, l'une est que ces effecteurs élicitent l'exsudation d'eau et de nutriments des

cellules végétales dans l'apoplaste, et l'autre est qu'elles permettent la suppression de la réponse immunitaire de l'hôte. Les effecteurs peuvent être soit extra- soit intra-cellulaires. Les effecteurs extracellulaires, appelés harpines, codés principalement par les gènes *hrpZ* et *hrpW*, peuvent induire une réaction d'hypersensibilité lorsqu'ils sont injectés dans les espaces intercellulaires (He *et al.*, 1993; Charkowski *et al.*, 1998). Les effecteurs intracellulaires contiennent entre autres des protéines d'avirulence (Avr) impliquées dans la reconnaissance gène-pour-gène et l'induction de mécanismes de défense chez les plantes.

### **II.3. Pouvoir glaçogène de *P. syringae***

L'eau extra-pure peut rester en surfusion jusqu'à des températures de l'ordre de -40 °C. Dans la nature l'état de surfusion de l'eau est rompu par des noyaux glaçogènes à des températures négatives avoisinant 0 °C. Ces noyaux glaçogènes peuvent être des particules inorganiques telles que des poussières minérales ou métalliques, cependant elles ne sont efficaces qu'à des températures inférieures à -10 °C, ou des particules organiques, telles que des acides aminés, protéines et terpènes, qui quant à elles peuvent induire la formation de glace à des températures plus élevées avoisinant les -5 °C (Gaignard and Luisetti, 1993). Dès la fin des années 1950 l'existence de particules biologiques pouvant induire la formation de glace à des températures situées entre -2 et -4 °C est soupçonnée, mais il faudra attendre le début des années 70 pour en avoir la preuve et l'identification de *P. syringae* comme noyau glaçogène (Maki *et al.*, 1974). Par la suite l'activité glaçogène a été identifiée chez d'autres espèces bactériennes telles que *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia herbicola* et *Xanthomonas translucens* (Gaignard and Luisetti, 1993).

L'activité glaçogène est variable au sein d'une espèce, et dans le cas de *P. syringae* la capacité



**Figure 9. Spectre d'activité glaçogène d'une souche de *P. syringae*.** Les cellules de *P. syringae* sont mise en suspension dans du tampon phosphate (0.1 M, pH 7) à raison d'environ 10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>. Une série de dilutions de facteur dix a été réalisée à partir de cette suspension. Des gouttelettes de chaque dilution, ainsi que de la suspension d'origine, ont été déposées sur un bloc d'aluminium. Le bloc a ensuite été refroidi, et la température de prise en glace de chaque goutte a été enregistrée. Chaque point représente l'activité glaçogène des différents échantillons provenant des dilutions précédemment préparées. La concentration de noyaux glaçogène (Ice Nuclei, N) à la température T [N(T)] de chaque suspension a été calculée selon la méthode de Vali (1995). La fréquence de nucléation (Nucleation Frequency) correspond au nombre de noyaux glaçogène par rapport au nombre de cellules bactériennes. Figure extraite de Hirano and Upper (2000).

à rompre l'état de surfusion de l'eau n'est pas identique pour toutes les souches, ni pour toutes les cellules d'une même souche. De plus la fraction de cellules se comportant en tant que noyaux glaçogènes augmente avec la diminution de la température au-delà de -1 °C (Figure 9).

Le gène responsable de cette activité glaçogène, appelé gène *ina* pour ice nucleation activity, a été identifié et séquencé à partir de souches de *P. syringae* (Green and Warren, 1985), mais également d'autres espèces bactériennes (Warren *et al.*, 1986; Warren and Corotto, 1989; Zhao and Orser, 1990). Dans tous les cas il s'agit d'un cadre de lecture ouverte (ORF) d'environ 4000 pb avec une partie centrale contenant des motifs répétés de 24, 48, et 144 nucléotides. Des analyses comparatives des séquences du gène *ina* des différentes espèces bactériennes a permis d'émettre l'hypothèse que ces gènes soient tous issus d'un même ancêtre commun, et qu'ils auraient été acquis via des transferts horizontaux au sein de populations épiphytes (Wolber and Warren, 1991).

Cette activité glaçogène peut jouer un rôle important dans les processus infectieux des souches de *P. syringae* qui en sont dotées en créant des portes d'infection. En l'absence de bactéries glaçogènes on peut observer de l'eau sous forme liquide sur les plantes jusqu'à des températures avoisinant les -5 °C. Cependant en présence de bactéries glaçogènes telles que *P. syringae*, la formation de glace peut avoir lieu à températures allant de 0 à -2 °C, s'accompagnant parfois de dégâts de gel qui sont le résultat de la destruction des tissus par formation de glace intracellulaire. De plus, l'alternance de phases de gel et de dégel est un facteur favorisant l'entrée et la propagation de *P. syringae* dans les espaces intercellulaires via des phénomènes d'aspiration de l'eau, et est très souvent associée à l'apparition de chancres et à la propagation de chancres existants (Klement *et al.*, 1984; Vigouroux, 1999). Le lien entre l'abondance des bactéries glaçogènes et le nombre de dégâts observés sur plantes a été



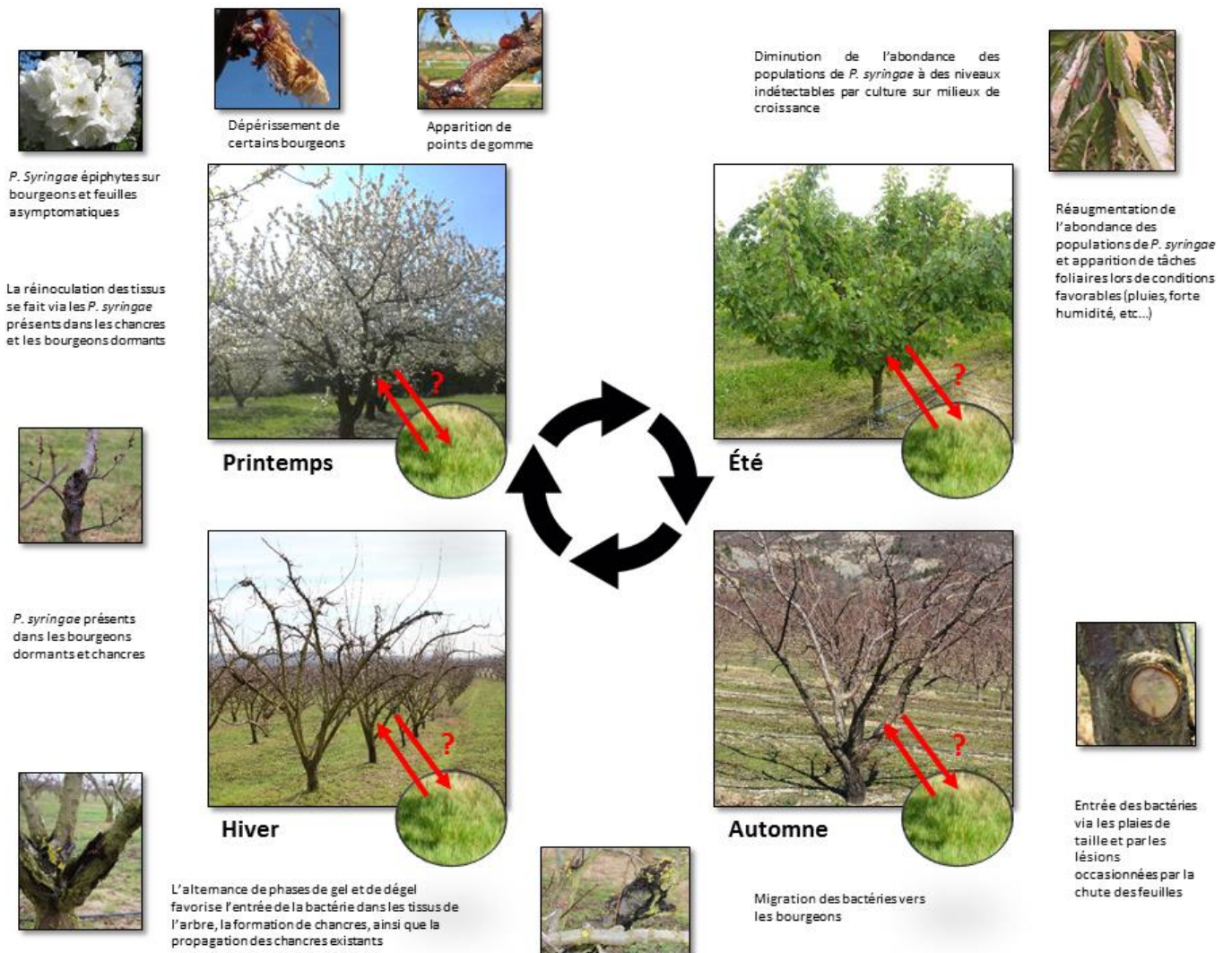
démonstré, et différents travaux ont mis en évidence la diminution des dégâts de gel par pulvérisation de souches mutantes  $ina^-$ , qui diminuaient l'abondance des populations  $ina^+$  par des phénomènes de compétitions intra-spécifiques (Lindow, 1990, 1995).

## **II.4. Epidémiologie des maladies provoquées par *P. syringae* chez les arbres fruitiers**

### **II.4.1. Chancre bactérien des arbres fruitiers à noyaux**

Depuis le début du XXI<sup>ème</sup> siècle, *P. syringae* a été reconnu coupable de l'émergence de maladies sur plus d'une vingtaine de plantes ligneuses dans 25 pays. Les dégâts causés chaque année par *P. syringae* se chiffrent en centaines de millions de dollars. Par exemple, les pertes annuelles au niveau de la production de fruits à noyaux en Afrique du Sud se chiffrent à plus de 10 millions de dollars, et en 2012 la destruction de plusieurs milliers d'hectares de vergers de kiwis en Nouvelle Zélande a engendré des pertes estimées à plus de 70 millions de dollars (Lamichhane *et al.*, 2014).

Généralement le cycle de la maladie du chancre bactérien des arbres fruitiers causé par *P. syringae* débute au printemps par la colonisation et le développement de populations épiphytes importantes au niveau des bourgeons des arbres. Les arbres sont généralement considérés comme la source d'inoculum principale, cependant les couvre-sols, compte tenu de leur capacité à héberger des populations importantes de *P. syringae*, semblent également pouvoir contribuer à cet inoculum initial. Ainsi au printemps il est possible d'observer des populations ayant des abondances de l'ordre de  $10^4$  à  $10^6$  CFU  $g^{-1}$  de tissu végétal au niveau des bourgeons. Un fort taux d'humidité et des températures négatives favorisent l'apparition de la maladie.



**Figure 10. Illustration du cycle du chancre bactérien des arbres fruitiers à noyaux causé par *P. syringae*. Ajout du couvre-sol végétal comme réservoir et source hypothétique d'inoculum de *P. syringae* pour les arbres fruitiers.**

L'alternance de phases de gel et de dégel favorise l'entrée de la bactérie dans les tissus par des phénomènes d'aspiration d'eau. Lors du gel il y a perte d'eau par les cellules végétales et formation de glace dans les espaces intercellulaires. Ce phénomène est d'autant plus prononcé que la teneur initiale en eau des arbres est élevée. Puis lors du dégel, l'aspiration de l'eau par les cellules végétales entraîne un flux emportant les bactéries épiphytes dans les espaces intercellulaires sur des distances plus ou moins importantes selon la teneur en eau des arbres (Vigouroux, 1999). Les blessures issues de la taille des arbres fournissent également des voies d'entrées pour la bactérie. De ce fait les tailles hivernales ne sont pas recommandées, car celles-ci aboutissent généralement des infections accrues des arbres liées aux températures négatives (Weaver, 1978; Vigouroux, 1989; Sobiczewski and Jones, 1992). Durant l'été il est possible d'observer l'apparition de tâches foliaires nécrotiques entourées d'un halo chlorotique jaune, mais aussi des populations épiphytes survivant sur des feuilles et autres tissus asymptomatiques. Généralement en été, l'abondance des populations de *P. syringae* diminue à des niveaux indétectables, et celles-ci ne réaugmentent qu'à l'automne avec la diminution des températures et la recrudescence des épisodes pluvieux (Crosse, 1957, 1966; Sundin *et al.*, 1988). A l'automne, les lésions générées par la chute des feuilles fournissent de nouvelles portes d'entrées pour la bactérie. Les *P. syringae* épiphytes vont migrer vers ces blessures et il est possible d'observer une colonisation systémique, aboutissant à l'envahissement des bourgeons dormants (Crosse, 1956; Roos and Hattingh, 1986a; Sundin *et al.*, 1988). Ces bourgeons maintiennent généralement une apparence saine et participent à l'infestation des arbres au printemps suivant. La figure 10 reprend les principales étapes du cycle de la maladie des arbres fruitiers à noyaux, et autres arbres fruitiers, causée par *P. syringae*. Compte tenu de la présence d'importantes populations de *P. syringae* sur les plantes couvre-sol et adventices, celles-ci ont été rajoutées comme source



**Figure 11. Illustrations des symptômes liés à une infection par *P. syringae* (i).** Dépérissement de jeunes pousses de merisier (*Prunus avium*) (A), de poirier (*Pyrus communis*) (B et C), et de prunier (*Prunus domestica*) (D). Illustrations extraites de Kennelly *et al.* (2007).



**Figure 12. Illustrations des symptômes liés à une infection par *P. syringae* (ii).** Lésions sur fruits (A) et taches nécrotiques sur feuilles (B) de merisier (*Prunus avium*). Illustrations extraites de Kennelly *et al.* (2007).

hypothétiques d'inoculum de *P. syringae* pathogènes des arbres fruitiers dans le schéma du cycle épidémiologique.

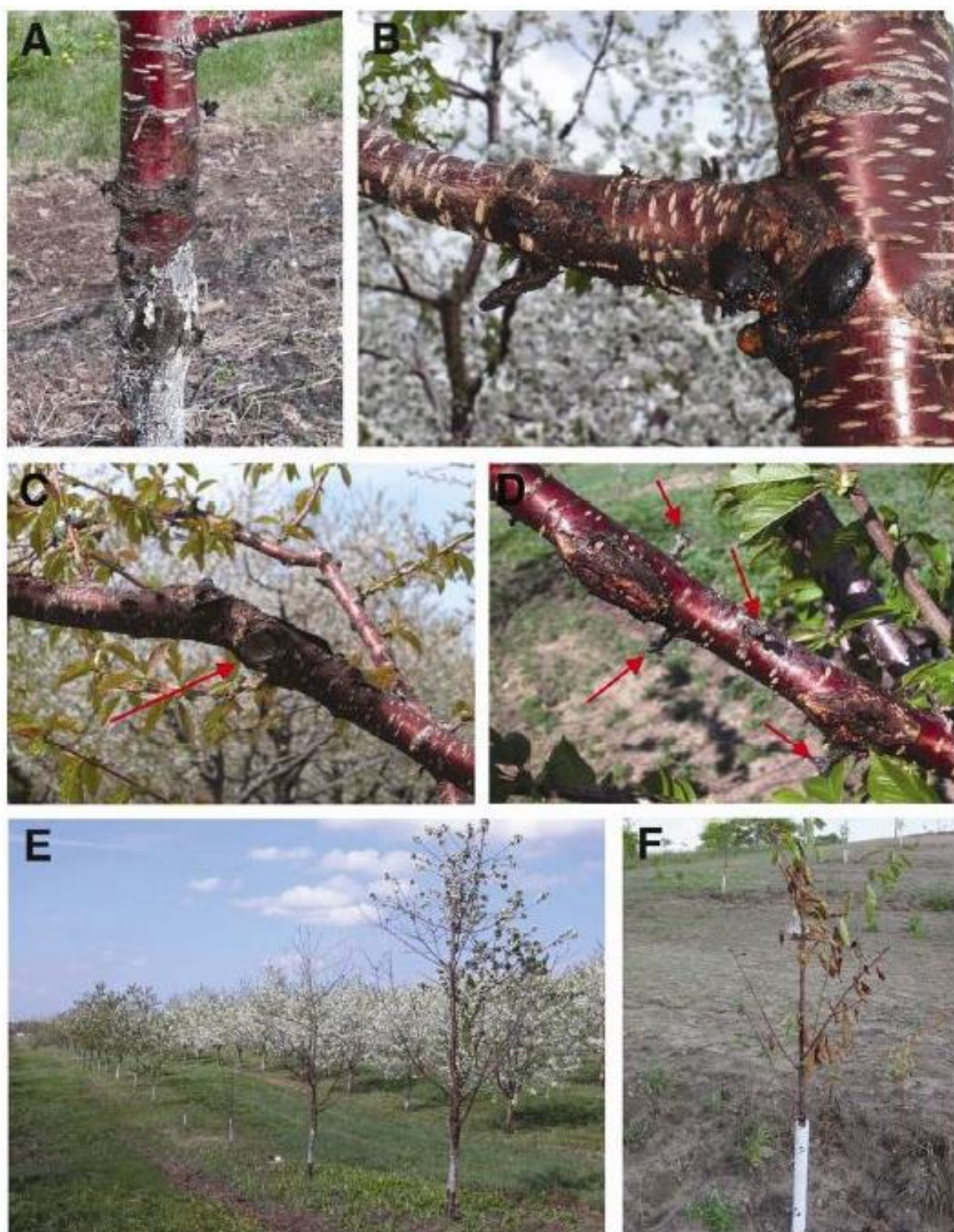
Les symptômes caractéristiques d'une infection par *P. syringae* sont illustrés dans les figures 11 à 13. Ces symptômes sont similaires pour l'ensemble des arbres fruitiers à noyaux.

#### **II.4.2. Chancre bactérien du kiwi, causé par *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa)**

Depuis un peu moins d'une dizaine d'années *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), agent du chancre bactérien du kiwi, est devenu la menace principale des régions productrices de kiwis à chaire verte (*Actinidia deliciosa*) et jaune (*A. chinensis*) dans le monde. L'impact économique pour les arboriculteurs est estimé entre 15000 à 50000 € ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> (Donati *et al.*, 2014). En France on estime qu'environ 10 % de la surface de production de kiwi serait atteinte par le Psa, soit plus de 370 ha sur les 4300 ha cultivés (Fritsch *et al.*, 2012).

Au cours des quatre dernières décennies plusieurs émergences de Psa ont été signalées dans le monde. La première émergence remonte au début des années 1980 au Japon, en Chine, en Corée et en Italie (Serizawa *et al.*, 1989; Takikawa *et al.*, 1989; Fang *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1993; Koh *et al.*, 1994; Scortichini, 1994; Cheng *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005).

Depuis 2008 une nouvelle souche de Psa plus agressive a émergé et s'est rapidement répandue à l'ensemble des zones productrices de kiwis dans le monde. L'émergence a débutée en Italie (Balestra *et al.*, 2009b; Balestra *et al.*, 2009a; Balestra *et al.*, 2013), puis Psa s'est propagé en France (Vanneste *et al.*, 2011c), en Espagne (Abelleira *et al.*, 2011; Balestra *et al.*, 2011), en Suisse (EPPO, 2011d), au Portugal (Balestra *et al.*, 2010), en Turquie (Bastas and Karakaya, 2012), en Allemagne (EPPO, 2011a), et en Slovénie (Dreo *et al.*, 2014). Cette



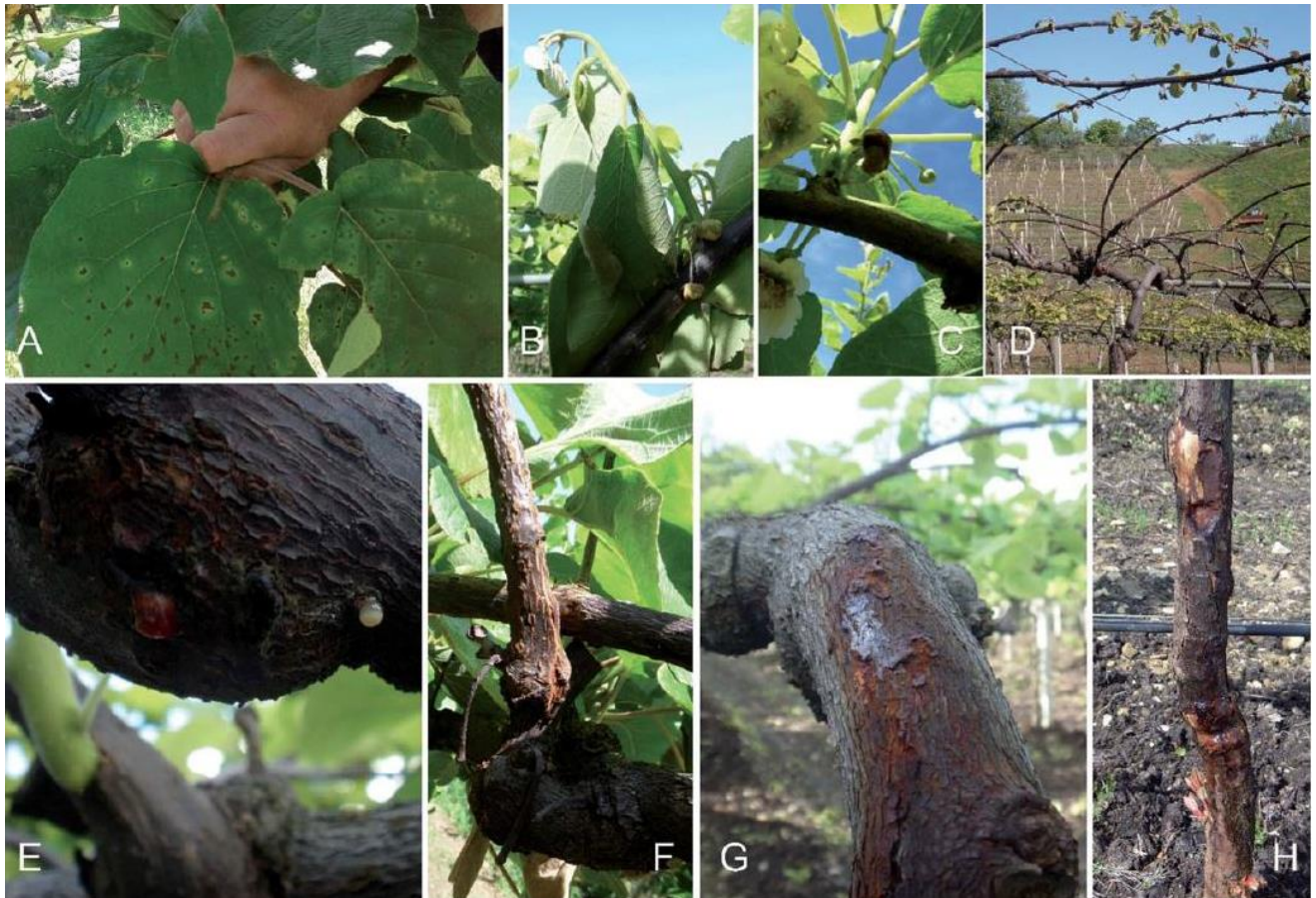
**Figure 13. Illustrations des symptômes liés à une infection par *P. syringae* (iii).** Chancres sur tronc de merisier (A), chancre se propageant d'une tige vers une charpentière et apparition de points de gomme (B), chancre au niveau d'une plaie de taille (indiquée par la flèche rouge) (C), chancre entraînant la mort de jeunes pousses (indiquées par des flèches rouges) (D), diminution de la vigueur et du nombre de fleurs des arbres infectés (E), un jeune merisier mort à la suite d'une infection systémique (F). Illustrations extraites de Kennelly *et al.* (2007).

nouvelle souche est également retrouvée en Asie de l'est et en Chine (Tu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013), au Japon (Sawada *et al.*, 2014), en Corée du sud (Koh *et al.*, 2010; Koh *et al.*, 2012), en Océanie et Nouvelle Zélande (Everett *et al.*, 2011; Vanneste *et al.*, 2011a), en Australie (EPPO, 2011c), et au Chili (EPPO, 2011b).

Les souches de Psa issues des premières observations au Japon et en Italie au début des années 1980 sont très proches, elles se distinguent des souches de Psa coréennes, ainsi que de celles responsables de l'émergence de 2008. Ces souches constituent trois lignées génétiques différentes, celle de 2008 est considérée comme plus agressive que les deux précédentes et a été renommée Psa-V, V pour virulent. Ces souches Psa-V possèdent les gènes codant pour le T3SS tel qu'il a été décrit pour les autres souches pathogènes de *P. syringae*, mais ne possèdent pas les gènes nécessaires à l'expression de la phaseolotoxine et la coronatine (Marcelletti *et al.*, 2011; Scortichini *et al.*, 2012). Une analyse génomique plus récente, de plusieurs génomes de Psa, combinée à l'historique d'émergence de la maladie semblent indiquer une origine chinoise des souches de Psa-V italiennes, néo-zélandaises, et chiliennes (Butler *et al.*, 2013).

Psa infecte les plantes par les stomates, les lésions qui apparaissent lors de la chute des fruits et des feuilles, ainsi celles engendrées lors de la taille des plants de kiwi (Spinelli *et al.*, 2011; Spinelli *et al.*, 2013b). Des études ont montrés que Psa était capable de survivre sur le pollen des fleurs mâles, et que celui-ci pouvait, lors du dépôt sur des fleurs femelles, être à l'origine de contaminations systémiques (Chapman *et al.*, 2011; Vanneste *et al.*, 2011b; Spinelli *et al.*, 2013a).

Les symptômes typiques observables lors d'une infection par Psa sont l'apparition de tâches nécrotiques angulaires sur les feuilles, une décoloration rougeâtre visible sous l'écorce, la production d'un exsudat couleur rouille, la nécrose des bourgeons, le flétrissement des



**Figure 14. Illustrations des symptômes liés à une infection par *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa).** Tâches nécrotiques entourées d'un halo chlorotique jaunâtre (A), dépérissement d'une jeune pousse (B), nécrose florale (C), retard du développement des bourgeons (D), exsudats visibles sur une canne infectée (E), coloration rouge des lenticelles (F), chancre bactérien avec exsudats à la surface d'une charpentière (G), décoloration rougeâtre visible sous l'écorce au niveau des chancres (H). Dans le cas présent il s'agit de plants de kiwis (*Actinidia deliciosa*) de la variété Hayward, cependant les symptômes d'une infection par Psa sont similaires sur les autres variétés et espèces de kiwis. Illustrations extraites de Donati *et al.* (2014).



feuilles, une coloration rouge des lenticelles, la chute de fruits, ainsi que le dépérissement de cannes et de charpentières en raison de l'obstruction du système vasculaire par la bactérie (Donati *et al.*, 2014). Les différents symptômes sont illustrés dans la Figure 14.

Le cycle de la maladie du chancre bactérien du kiwi causé par *Psa* est similaire à celui décrit précédemment pour les arbres fruitiers à noyaux. Durant le printemps *Psa* va infecter les feuilles, fleurs et bourgeons, se disséminer via le pollen, et se vasculariser (Serizawa and Ichikawa, 1993c; Spinelli *et al.*, 2011). Il est possible d'observer un retard dans le développement des bourgeons, des chancres, des exsudats, des tâches foliaires, ainsi que le flétrissement des feuilles. Les exsudats constituent une importante source d'inoculum qui va être dispersée par la pluie et le vent (Serizawa *et al.*, 1989; Serizawa and Ichikawa, 1993a). En été, lorsque les températures dépassent les 25 °C, le développement bactérien est ralenti, cependant il est possible d'observer des populations épiphytes de *Psa* sur les feuilles (Stefani and Giovanardi, 2011), parfois associées à la présence de tâches foliaires, mais aussi le dépérissement de plants de kiwi dont l'ensemble du système vasculaire a été colonisé par la bactérie (Serizawa and Ichikawa, 1993b; Spinelli *et al.*, 2011). A l'automne, on observe parfois le dépérissement de certaines cannes, et *Psa* infecte ou réinfecte les plants de kiwi via les lenticelles, les bourgeons, ainsi que les blessures dues à la chute des feuilles, la récolte des fruits, et de la taille des vignes (Serizawa *et al.*, 1994). Il a également été démontré que *Psa* était capable de survivre dans la litière constituée par les feuilles et les débris de taille (Marcelletti *et al.*, 2011; Tyson *et al.*, 2012). Cependant le rôle de cette litière dans le cycle de la maladie n'est pas encore élucidé. Et enfin en hiver, la bactérie se multiplie au sein des tissus et il est possible d'observer l'apparition de chancres, ainsi que l'extension de chancres préexistants. Les souches de *Psa* de l'épidémie actuelle ne possèdent pas d'activité glaçogène, cependant la formation des chancres et la migration bactérienne au sein des tissus sont



**Figure 15. Illustrations des symptômes causés par Psa sur feuilles de kiwi et trois espèces végétales associées aux vergers de kiwis.** Comparaison des symptômes observés en verger sur feuille de kiwi atteint par Psa, présentant les taches nécrotiques angulaires typiques d'une infection par Psa (a), sur feuilles de *Setaria viridis* poussant sous des plants de kiwi infectés par Psa, sur lesquelles on observe des taches irrégulières entourées d'un halo rougeâtre (b), sur feuilles d'*Alternanthera philoxeroides* situées à proximité de vergers de kiwis infectés par Psa, sur lesquelles on observe des taches nécrotiques circulaires entourées d'un halo jaunâtre (c), et sur feuilles de *Paulownia tomentosa* également situées à proximité de vergers de kiwis infectés par Psa, sur lesquelles on observe des taches nécrotiques brunes entourées d'un halo jaunâtre (d). Illustrations extraites de Liu *et al.* (2016).

favorisées par l'alternance de phases de gel et de dégel (Ferrante and Scortichini, 2014).

Récemment il a été montré que certaines espèces végétales fréquemment retrouvées parmi les plantes couvre-sol des vergers de kiwis, *Setaria viridis*, *Alternanthera philoxeroides* et *Paulownia tomentosa*, pouvaient se comporter en tant qu'hôtes alternatifs de Psa (Liu *et al.*, 2016). Ces plantes présentent sur leurs feuilles des tâches nécrotiques similaires à celles observées sur celles de plants de kiwis atteints par Psa (Figure 15). Des isollements bactériens ont permis d'identifier Psa, et la reproductibilité des symptômes a été testée avec succès en conditions contrôlées. Il s'agit de la première étude à démontrer la survie de Psa en dehors de son hôte associé à la présence de symptômes foliaires similaires à ceux de plants de kiwis infectés. Auparavant seule l'étude de Vanneste *et al.* (2012) avait tentée d'évaluer la survie de Psa sur une espèce non hôte, *Cryptomeria japonica*, utilisée comme brise vent dans les vergers de kiwis néo-zélandais. La présence épiphyte de Psa a été démontrée, cependant les populations décroissent au cours du temps et disparaissent totalement au bout d'une dizaine de jours, y compris lors d'inoculations artificielles (Vanneste *et al.*, 2012). Compte tenu des nombreux microorganismes pathogènes présents sur les plantes couvre-sol et adventices des vergers, cette découverte supplémentaire renouvelle la question du rôle de ces plantes dans les cycles épidémiologiques des microorganismes pathogènes, ainsi que dans l'émergence des maladies des arbres fruitiers.

## **II.5. Moyens de lutte actuels**

Les méthodes actuelles visent à réduire les populations épiphytes de *P. syringae*, constituant l'une des sources principales d'inoculum des arbres fruitiers. Il s'agit essentiellement de lutte chimique, mais également de lutte biologique par utilisation de microorganismes

antagonistes, ainsi que de mesures prophylactiques tels qu'une taille hors des saisons de vulnérabilité des arbres et la désinfection systématique des outils de travail, ou encore la plantation de variétés résistantes (levier génétique).

La lutte chimique est essentiellement réalisée avec des sels de cuivre et des antibiotiques (Cameron, 1962; Ercolani, 1967; Matthee and Erskine, 1971; Prunier *et al.*, 1985).

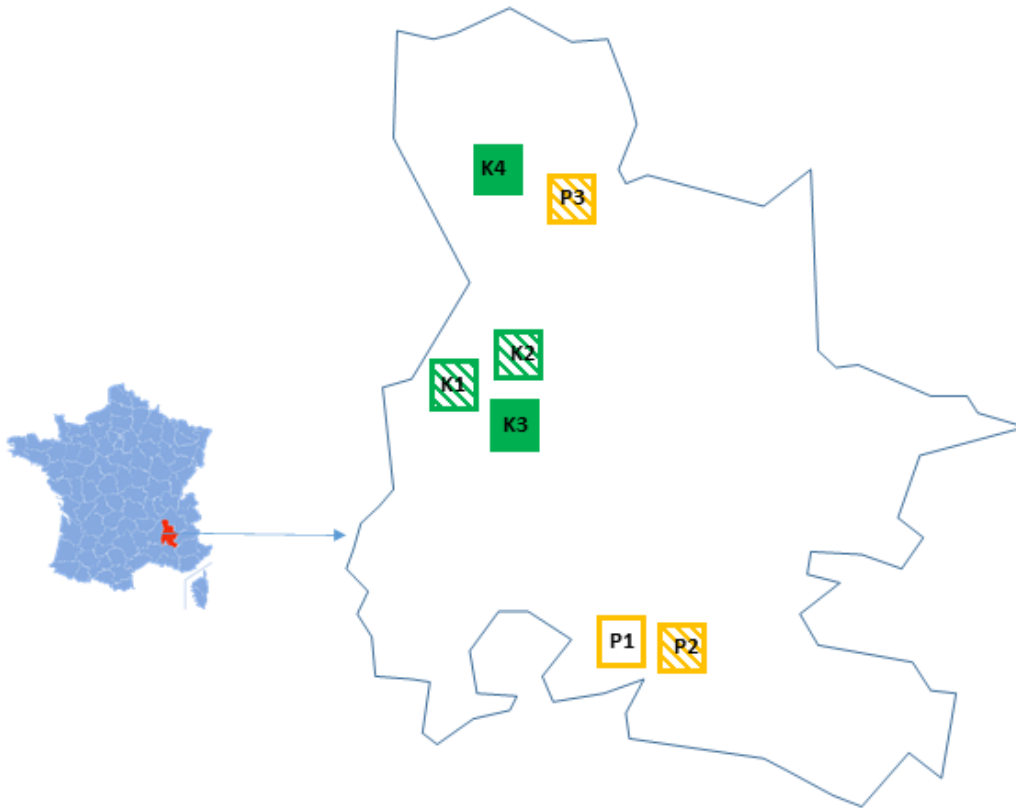
L'utilisation des antibiotiques n'est autorisée qu'exceptionnellement en Europe. L'utilisation des antibiotiques tels que la tétracycline, la streptomycine, et la gentamicine est interdite. Effectivement, le danger de l'utilisation d'antibiotiques est l'apparition de souches microbiennes résistantes, d'autant plus si la résistance est plasmidique du fait de la possible transmission des plasmides via simple conjugaison bactérienne. L'apparition de souches de *P. syringae* résistantes s'est développée depuis la fin des années 1980 avec l'autorisation de l'utilisation de la streptomycine en Asie et Nouvelle Zélande (Goto, 1991; Sobiczewski *et al.*, 1991; Koh *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Vanneste *et al.*, 2011b). Des gènes de résistance à la streptomycine ont été détectés chez des souches de Psa au Japon (Nakajima *et al.*, 2002) soulevant la question de la chronologie de leur apparition par rapport à l'utilisation de la streptomycine en culture de kiwi.

En Europe, les traitements constitués de composés cupriques restent la base de la lutte face au chancre bactérien causé par *P. syringae* et sont autorisés en agriculture biologique (Vanneste *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Vanneste *et al.*, 2010). En France, plusieurs formulations cupriques sont fréquemment utilisées : le sulfate de cuivre, l'hydroxyde de cuivre, le chélate de cuivre et l'oxyde cuivreux (*e.g.* Nordox) (Gaignard and Luisetti, 1992; Luisetti *et al.*, 1992). Cependant comme pour les antibiotiques, on peut observer de la phytotoxicité, l'apparition de souches résistantes et des dépôts résiduels dans les fruits. Des souches de Psa résistantes au cuivre ont été isolées au Japon (Nakajima *et al.*, 2002; Goto *et al.*, 2004), mais dans aucune

des souches isolées depuis 2008 en Italie (Ferrante and Scortichini, 2010). Les gènes *copA* et *copB*, induisant une résistance partielle au cuivre, ont été détectés chez quelques souches de la lignée génétique responsable de la pandémie actuelle du chancre bactérien du kiwi. Cependant aucune de ces souches de *Psa* ne renfermait les gènes *copS* et *copR*, responsables d'une résistance maximale au cuivre (Cooksey, 1994; Marcelletti *et al.*, 2011).

La lutte biologique quant à elle, consiste en l'utilisation de souches microbiennes antagonistes des *P. syringae* pathogènes. Différentes études ont montrées qu'il était possible de réduire les populations de *P. syringae* pathogènes d'un facteur 10 à 500 et protéger les plantes contre les dégâts de gel en utilisant diverses souches bactériennes antagonistes telles que *P. fluorescens*, *P. putida*, *Erwinia carotovora*, et *E. herbicola* (Lindow, 1982; Cody *et al.*, 1987; Sobiczewski, 1987; Kim *et al.*, 1989). La première expérience d'utilisation d'un microorganisme génétiquement modifié dans le cadre de la lutte biologique a été proposée par Lindow avec une souche de *P. syringae* non glaçogène par mutation de son gène *ina*. La pulvérisation de cette souche mutante sur les plantes a permis de réduire de façon significative les populations de *P. syringae* glaçogène et ainsi les dégâts de gel (Lindow, 1986, 1988, 1990).

L'efficacité des moyens de lutte actuels reste limitée et compte tenu de la prise de conscience de l'importance de la préservation de l'environnement par les consommateurs et les producteurs, les méthodes de cultures actuelles ont tendance à s'orienter de plus en plus vers une agriculture durable. L'amélioration des connaissances concernant les différents facteurs environnementaux impliqués dans les cycles épidémiologiques des maladies des arbres fruitiers, mais également des autres cultures, pourraient aboutir à la mise au point de nouvelles méthodes d'agroécologie et d'ingénierie écologique permettant l'amélioration de la santé des cultures.



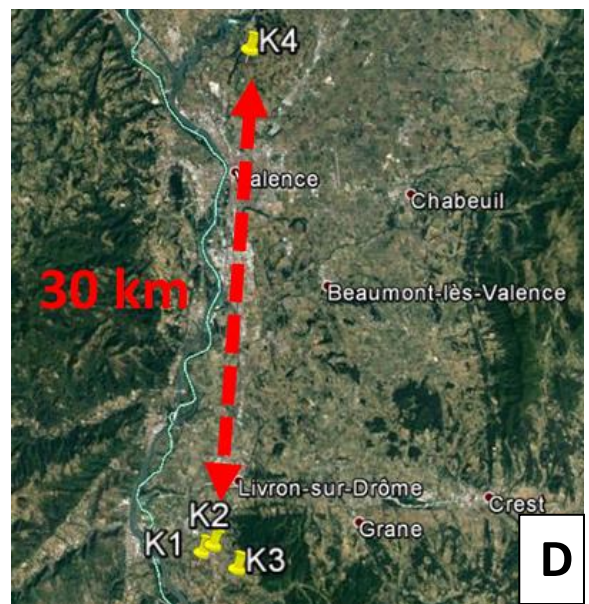
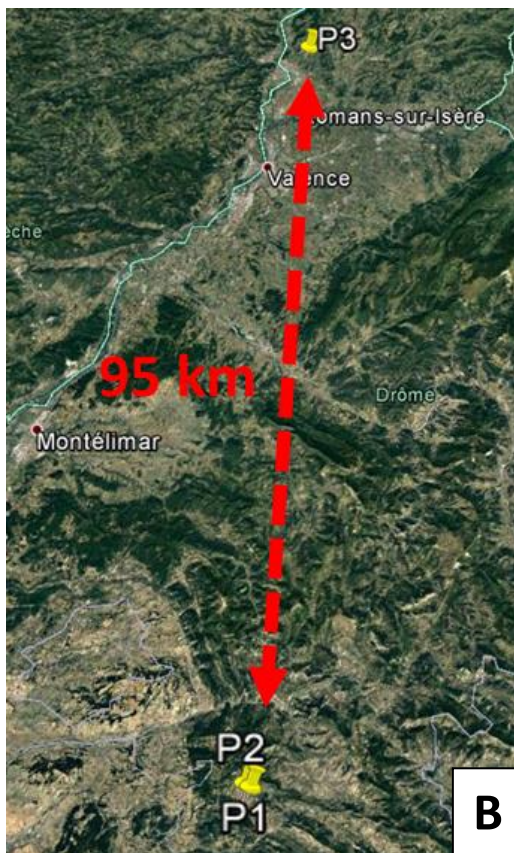
**Figure 16.** Localisations des trois vergers d'abricotiers (■), P1, P2 et P3, ainsi que des quatre vergers de kiwis (■), K1, K2, K3 et K4. La gestion du couvre-sol est indiquée pour chaque verger : enherbement de la totalité de la surface du verger (■), inter-rangs enherbés et rangs désherbés par herbicides (▨), et enfin inter-rangs et rangs désherbés par herbicides associés à un travail mécanique du sol (□).

## Contexte

Les travaux présentés ci-après ont pour objectifs d'améliorer les connaissances concernant les réservoirs d'inoculum, et en particulier les couvre-sols végétaux des vergers, de *P. syringae* qui est impliqué dans l'émergence de maladies des arbres fruitiers, et d'identifier de potentielles méthodes de lutte utilisant les principes de l'agroécologie et de l'ingénierie écologique.

La réalisation de ces travaux a nécessité, dans un premier temps, la création d'outils permettant une identification rapide et peu coûteuse de *P. syringae* et une caractérisation de sa diversité génétique provenant d'un échantillonnage suffisamment grand pour brasser une diversité de contextes de vergers de kiwis et de les comparer avec les vergers d'abricotiers de la Drôme. Nous avons réalisé un échantillonnage exhaustif des communautés microbiennes des couvre-sols et arbres de trois vergers d'abricotiers de la variété Bergeron (*Prunus armeniaca*) greffée sur Myrobolan (*Prunus cerasifera*), appelés P1, P2 et P3, ainsi que quatre vergers de kiwis (*Actinidia deliciosa*) composés de plants femelles de la variété Hayward et de plants mâles des variétés Tomuri et Matua, appelés K1, K2, K3 et K4, localisés dans le département de la Drôme (Sud-Est de la France)(Figures 16 et 17). La campagne d'échantillonnage a abouti à la collecte de plus de 400 échantillons de tissu végétal et la mise en collection de plus de 5000 isolats putatifs *P. syringae*.

Les vergers P2, P3, K1 et K2 ont été choisis pour leur enherbement sur les inter-rangs et le désherbage à l'aide d'herbicides sur les rangs des arbres. Les vergers K3 et K4 ont été choisis pour leur enherbement sur l'ensemble de la surface du verger, et enfin le verger P1 était le seul à n'avoir aucun couvert végétal et son sol était maintenu nu en combinant travail mécanique et usage d'herbicides.



**Figure 17.** Images satellites, obtenues via Google Earth, et localisations des vergers d'abricotiers (A et B) et de kiwis (C et D) les uns par rapport aux autres.



Les quatre vergers de kiwis étaient irrigués par un système de micro-aspersion suspendu, alors que les vergers d'abricotiers P2 et P3 étaient irrigués par un système de goutte-à-goutte au pied des arbres. Le verger P1 quant à lui n'était pas irrigué. La particularité de l'irrigation du verger P2 est que l'eau provenait d'un réservoir alimenté en partie par les eaux de ruissellement des vergers alentours (Figure 17A).

Lors de l'étude, les abricotiers des vergers P1, P2 et P3 présentaient de nombreux symptômes caractéristiques d'une infection par *P. syringae*, tels que des chancres sur tiges, charpentières et troncs, ainsi qu'un fort taux de mortalité (jusqu'à 40 % d'arbres replantés). Les vergers de kiwis K1 et K3 ne présentaient aucun symptôme et ont été considérés comme des vergers sains. Le verger K2, situé à côté d'une parcelle de kiwis fortement contaminée et arrachée en automne 2013, renfermait quelques plants de kiwis présentant des symptômes caractéristiques d'une infection par *P. syringae*, tels que des taches foliaires nécrotiques, des chancres sur cannes, charpentières et troncs, ainsi que des exsudats couleur rouille. Et enfin le verger K4, situé le plus au Nord dans l'une des zones d'émergence de la bactériose du kiwi causée par Psa en France, présentait des symptômes typiques sur l'ensemble des plants de kiwis.

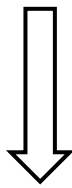
Initialement la thèse était construite autour de quatre grandes hypothèses :

- (i) que les couvre-sols des vergers hébergent des populations de *P. syringae* constituées d'un assemblage des différentes lignées génétiques qui composent l'espèce *P. syringae*, et aux abondances similaires aux populations hébergées par les prairies naturelles
- (ii) que la structure et l'abondance des populations de *P. syringae* sont fonction de l'espèce fruitière cultivée, ainsi que de la composition des communautés de plantes couvre-sol qui les hébergent

**Quel est le rôle des couvre-sols végétaux des vergers dans l'émergence des maladies des arbres fruitiers causées par *P. syringae* ?**



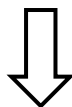
**Chapitre 1** : Mise au point d'une technique moléculaire permettant l'identification des principales lignées génétiques de *P. syringae*



**Chapitre 2** : Etude des effets de la saison, de l'espèce fruitière cultivée, ainsi que de la composition des communautés végétales sur les populations de *P. syringae* associées aux couvre-sols végétaux



**Chapitre 3** : Etude de l'effet de la gestion du couvert végétal sur les populations de *P. syringae* associées aux arbres fruitiers, et des liens entre les populations de *P. syringae* des plantes couvre-sol et celles des arbres fruitiers



**Chapitre 4** : Tentative d'ingénierie écologique appliquée aux communautés végétales d'un couvre-sol expérimental dans un objectif de réduction de l'abondance des *P. syringae*

**Figure 18.** Schéma général d'organisation des travaux de recherche de la thèse

- (iii) que les populations de *P. syringae* peuvent être modifiées de façon prévisible et significative par certaines pratiques de gestion des couvre-sols
- (iv) que les couvre-sols végétaux sont une source initiale d'inoculum des maladies des arbres fruitiers causées par *P. syringae*

Les résultats des travaux de recherche menés afin de répondre à ces hypothèses sont présentés en quatre chapitres (Figure 18). Le premier chapitre est dédié à la mise au point d'une méthode moléculaire permettant l'affiliation phylogénétique à 9 des 13 phylogroupes du complexe *P. syringae* décrits par les travaux de Berge *et al.* (2014). Le second chapitre est l'étude des populations de *P. syringae* des couvre-sols en fonction de la saison, de l'espèce fruitière cultivée, ainsi que de la composition des communautés végétales des couvre-sols. Le troisième chapitre concerne l'étude des populations de *P. syringae* des arbres fruitiers et l'influence de la gestion de l'enherbement sur celles-ci. Et enfin le quatrième chapitre est la description d'une tentative d'ingénierie écologique en parcelle expérimentale reproduisant un couvre-sol typique de verger et introduction d'une espèce végétale identifiée comme étant capable de moduler les communautés microbiennes. Il s'agit d'une espèce identifiée au cours des travaux réalisés dans le chapitre 2, et l'objectif est de voir s'il est possible de reproduire les effets observés sur le terrain, c'est-à-dire une réduction de l'abondance des populations de *P. syringae* du couvre-sol et donc une réduction de la pression d'inoculum de ce couvre-sol envers les arbres.

# Chapitre 1

---

**Mise au point d'une technique moléculaire permettant  
l'identification des principales lignées génétiques de *P.***

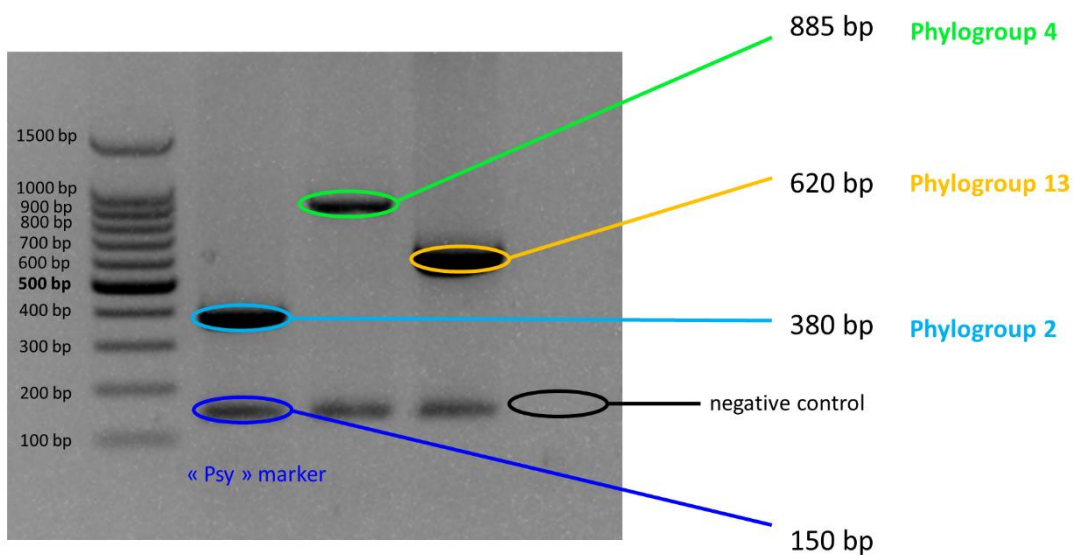
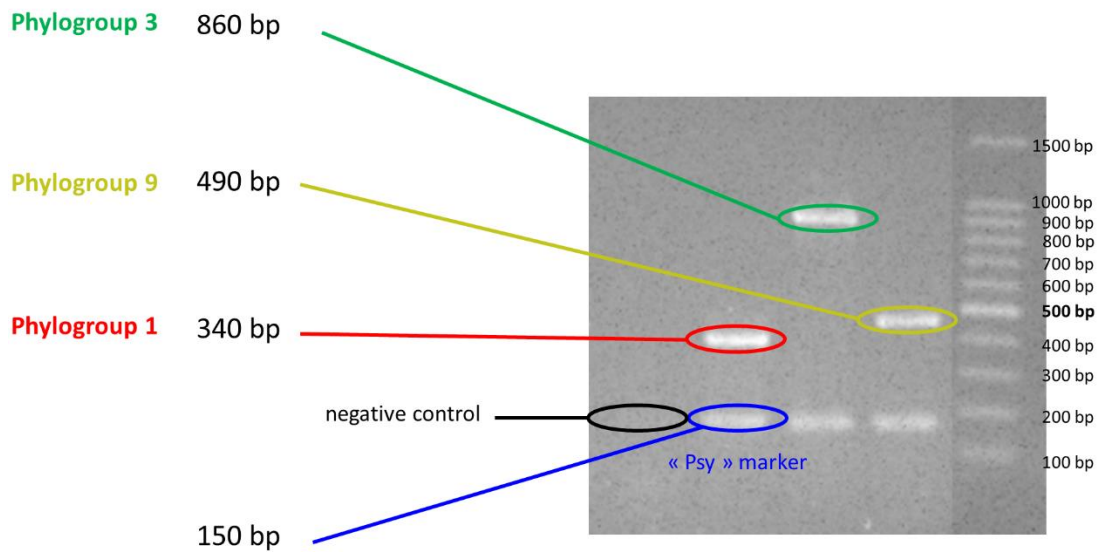
***syringae***

## I. Contexte

La classification actuelle du complexe *P. syringae* identifie 23 clades répartis en 13 phylogroupes (Berge *et al.* 2014). L'isolement de *P. syringae* à partir d'échantillons naturels se fait sur milieu semi-sélectif (KBC) (Mohan and Schaad, 1987), qui correspond à un milieu B de King modifié (King *et al.*, 1954). Jusqu'à récemment, l'identification des bactéries putatives *P. syringae* se faisait en observant les caractéristiques morphologiques et phénotypiques des colonies. Désormais une paire d'amorces moléculaires permet d'identifier *P. syringae* avec une grande sensibilité et spécificité (Guilbaud *et al.*, 2016). Cependant, l'affiliation des souches à l'un des 13 phylogroupes connus nécessite le recours au séquençage d'un ou plusieurs gènes de ménage. Compte tenu des prérequis nécessaire au séquençage, c'est-à-dire purification des souches et amplification PCR de la séquence cible, la caractérisation génétique de plusieurs centaines à milliers de souches issues d'échantillons naturels dans le cadre d'une étude des communautés reste très fastidieuse et couteuse.

## II. Objectif

L'objectif de ce premier travail est la mise au point de marqueurs moléculaires permettant une affiliation spécifique aux phylogroupes les plus fréquemment rencontrés dans les échantillons environnementaux à l'aide d'une technique moléculaire facile à mettre en œuvre et permettant le traitement simultané de nombreux échantillons. L'étude des génomes complets d'un ensemble de souches de *P. syringae* représentatives de la diversité génétique



**Figure 1.** Exemple de résultat obtenu en utilisant les deux PCRs multiplex, permettant l'identification des phylogroupes 1 (321 pb), 3 (837 pb) et 9 (389 pb), ainsi que 2 (341 pb), 4 (845 pb) et 13 (582 pb), respectivement. Le marqueur « psy » (144 pb) correspond au marqueur spécifique de *P. syringae* développé par Guilbaud *et al.* (2016).

du complexe sert à identifier des gènes uniques ou des polymorphismes nucléotidiques utilisables pour la mise au point d'amorces moléculaires spécifiques aux différents phylogroupes.

### **III. Résultats principaux**

L'étude des génomes complets de 54 souches de *P. syringae* a permis d'identifier des gènes et des zones de polymorphismes nucléotidiques spécifiques pour 7 des 13 phylogroupes de la classification actuelle et la mise au point de marqueurs moléculaires pour les phylogroupes 1, 2, 3, 4, 9, 10 et 13. Une étude antérieure à celle-ci a mis au point une paire d'amorces spécifiques des souches appartenant aux phylogroupes 7 et 8, génétiquement très proches (Bartoli *et al.*, 2014). Afin de réduire au minimum le nombre d'étapes de PCR nécessaires, les amorces ont été combinées entre elles en tenant compte de la taille des amplicons. Toujours dans un but d'optimisation, la paire d'amorces spécifiques de l'espèce *P. syringae* a également été intégrée dans le protocole (Guilbaud *et al.*, 2016). Ainsi on peut désormais tester des souches pour l'appartenance à l'espèce *P. syringae* et 9 des 13 phylogroupes en deux PCRs multiplex et deux PCRs simplex (Figure 1).

**Article publié dans Journal of Applied Microbiology Volume 120, Issue 3,  
Février 2016, Pages 714-723**

**A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas*  
*syringae* phylogroups**

B. Borschinger<sup>1,2</sup>, C. Bartoli<sup>3,4</sup>, C. Chandeysson<sup>1</sup>, C. Guilbaud<sup>1</sup>, L. Parisi<sup>1</sup>, J.F. Bourgeay<sup>1</sup>, E. Buisson<sup>2</sup>, C.E. Morris<sup>1\*</sup>

1-INRA, Unité de Pathologie Végétale, Domaine de St Maurice, BP 94, 84140 Montfavet, France

2-IMBE, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR CNRS IRD Aix Marseille Université, Site Agroparc BP 61207, 84911 Avignon, France

3-INRA, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441, F-31326 Castanet-Tolosan, France

4-CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR2594, F-31326 Castanet-Tolosan, France

\* Corresponding author: cindy.morris@paca.inra.fr

**Abbreviated running headline**

PCR for *Pseudomonas syringae* phylogroups



## Abstract

**Aims:** The aim of this study was to propose a rapid PCR-based method for the specific detection of individual phylogroups of the *Pseudomonas syringae* complex.

**Methods and Results:** Seven primer pairs were developed by analyzing whole genomes of 54 *P. syringae* strains. The specificity and sensitivity of these primer pairs were assessed on 236 strains from a large and comprehensive *P. syringae* collection. The method was also validated by characterizing the phylogenetic diversity of 174 putative *P. syringae* isolates from kiwifruit and apricot orchards of southeastern France.

**Conclusion:** Our PCR-based method allows for the detection and characterization of 9 of the 13 *P. syringae* phylogroups (phylogroups 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10 and 13).

**Significance and Impact of the Study:** To date, phylogenetic affiliation within the *P. syringae* complex was only possible by sequencing housekeeping genes. Here we propose a rapid PCR-based method for the detection of specific phylogroups of the *P. syringae* complex. Furthermore, for the first time we reveal the presence of *P. syringae* strains belonging to phylogroups 10 and 13 as epiphytes on plants whereas they had previously only been observed in aquatic habitats.

## Keywords

Plant pathogen, microbial ecology, pathobiome, multiplex PCR, orchards

## Introduction

In plant pathology, competitive or synergistic interactions among microorganisms have been disregarded in disease etiology. The emerging pathobiome concept pointed out that etiological agents can work in concert with indigenous microflora to induce disease (Vayssier-Taussat *et al.* 2014). The impact on disease of infra-specific diversity of microorganisms in individual hosts has been ignored. In the case of plant pathogenic bacteria, analyses of the structure of the pathogenic populations generally concern the metapopulation/population at large in a region (Scortichini 2005), but rarely addresses the structure of pathogen populations in individual plants. Phenomena of gain of fitness, as well as synergistic interactions, are not uncommon within strains of different genetic lines belonging to the same bacterial species and could enhance diseases (Kamoun and Kado 1990; Hirano *et al.* 1999; Scortichini 2005; Lamichhane and Venturi 2015). On the other hand, competition between strains of the same ecological niche could attenuate disease symptoms (Kerr and Htay 1974; Moss *et al.* 2007; Kawaguchi *et al.* 2014). In spite of these observations, conventional diagnosis of plant diseases has focused on the characterization of the dominant organisms in infected tissue. To address the issue of microbial complexes responsible for disease occurrence, detection methods that facilitate the assessment of the population structure in individual plants are needed. In addition, metagenomics approaches are in part unable to characterize the structure of different microbial communities at species level (Handelsman 2004; Walker *et al.* 2014; Barret *et al.* 2015). In light of these facts, we have developed a set of PCRs to rapidly identify the phylogenetic structure of the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* (Berge *et al.* 2014). This method requires strain isolation, thereby allowing subsequent evaluation of the pathogenicity of the isolated strains. *P. syringae* is a common environmental bacterium that

is ubiquitous in both aquatic and agricultural habitats where it can have both saprophytic and pathogenic behavior. *P. syringae* is also an important plant pathogen causing diseases such as kiwifruit canker reported in all kiwi-producing regions: Australasia, Europe and South America (Hirano and Upper 1990; Gaignard and Luisetti 1993; Vanneste 2013; Donati *et al.* 2014). Since the beginning of the 20<sup>th</sup> century, 55 cases of bacterial diseases in 25 countries and on 25 species of trees of agronomic importance were declared as being caused by this bacterium (Lamichhane *et al.* 2014). Likewise, in this same period *P. syringae* has been identified as the cause of nearly 70 new disease outbreaks affecting over 40 annual crop species (Lamichhane *et al.* 2015).

*P. syringae* is now recognized as a complex of at least 13 phylogroups (Berge *et al.* 2014). Each phylogroup displays unique phenotypes and it can be distinguished according to the sequence of one (for example citrate synthase) or a few (Multilocus Sequence Typing) housekeeping genes (Berge *et al.* 2014). Studies on the non-agricultural habitats (water, litter, wild plants, etc) showed that multiple *P. syringae* phylogroups can co-exist in the same sample (Morris *et al.* 2007; Monteil *et al.* 2013). However, there is a paucity of information about such co-existence in crops and about the possible role of co-existing strains in disease occurrence. In light of the current well-defined *P. syringae* classification and the numerous whole genome sequences that are available (Berge *et al.* 2014), we have sought to develop PCR primers that target as many of the phylogroups as possible to facilitate analysis of the *P. syringae* populations associated with diseased plants as well as with a range of environmental substrates. These molecular markers are more encompassing than those that have been developed to detect genetic lines that have pathovar names such as *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Mosqueda-Cano and Herrera-Estrella 1997), *P. syringae* pv. *tomato* (Zaccardelli *et al.* 2005), *P. syringae* pv. *aesculi* (Green *et al.* 2009) and *P. syringae* pv. *actinidiae* (Sawada

*et al.* 1997; Sawada *et al.* 1999; Koh and Nou 2002; Rees-George *et al.* 2010; Gallelli *et al.* 2011; Balestra *et al.* 2013; Gallelli *et al.* 2014; Loreti *et al.* 2014). Pathovar-specific markers could nevertheless be used in conjunction with phylogroup markers and also with the "universal" marker of all members of the *P. syringae* complex (Guilbaud *et al.*, 2016). This latter primer pair, called "Psy", allows for the identification of strains in the *P. syringae* complex with over 97% accuracy. This allows a real gain in time when identifying strains of *P. syringae*. However, this latter method does not identify the phylogroup affiliation of *P. syringae*.

Here, we propose a set of molecular markers identifying each of 9 major *P. syringae* phylogroups based on the current phylogenetic classification and the genomes of *P. syringae* accessible in public databases. We also describe a method to deploy these markers in a multiplex-PCR with the Psy primer set as a universal control for reliable detection and identification of *P. syringae* phylogroups. An example of the use of this method to characterize communities of *P. syringae* associated with kiwifruit and apricot plant samples from southeastern France is also reported.

## **Materials and Methods**

### **Strains and criteria used for primer design**

During this study 439 strains were used for 3 different objectives: i) to develop the primer pairs, ii) to validate the designed primers (specificity/sensitivity), and iii) to perform a "blind test" for the multiplex-PCR method on putative *P. syringae* isolates obtained from kiwifruit and apricot orchards from southeastern France. For primer development, DNA sequences were identified in whole genomes of 54 *P. syringae* strains (Table S1) available on the Joint

Genome Institute (JGI) platform (<http://jgi.doe.gov/>). The distribution of the corresponding strains within the various phylogroups is uneven and reflects the availability of the sequences. To evaluate the specificity and sensitivity of the primer pairs, 236 strains whose phylogroups were previously determined by citrate synthase (*cts*) gene sequencing, were used (Table S1). These 236 strains are part of the *P. syringae* collection of the Plant Pathology research Unit of the INRA PACA Avignon center. This collection is composed by over 7000 *P. syringae* strains isolated from crops and non-agricultural habitats.

Strains were maintained at -80°C in phosphate buffer containing 20% glycerol and were cultured on King's B medium (King *et al.* 1954) and incubated at 25°C for 48 hours prior each analysis. The strains used for primer development and for the specificity and sensitivity tests were pure culture strains.

Putative *P. syringae* isolates, not pure culture strains, were used for the "blind test" described below. These putative *P. syringae* isolates came from field sampling aiming to characterize *P. syringae* populations associated with kiwifruit and apricot orchards in southeastern France (Drôme county). Overall 174 putative *P. syringae* isolates were used. These isolates were collected from different substrates including leaves, buds, twigs, ground-cover, soil and irrigation waters (Table S1). For bacterial isolation, leaf, bud, twig and ground cover samples were homogenized with a stomacher in a phosphate buffer solution for 4 minutes. Soil samples were directly suspended with sterilized distilled water. Bacterial isolation from water samples was carried out according to the method previously described (Morris *et al.* 2010). For all the obtained suspensions, we performed dilution-plating on a modified King's B medium (KBC) (Mohan and Schaad 1987). KBC as used in this study was composed of 9 volumes of King's B medium with a smaller quantity of proteose peptone than the original recipe (1.5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 15g proteose-peptone, 10 ml glycerol and 16g agar in

**Table 1.** Genes used for primer development.

Strain	Genome Accession Number	Gene ID	Genomic Range (bp) *	Gene length (bp)	Protein Annotation	Presence in phylogroups †	Target Phylogroups ‡	Forward primer localization (bp)	Reverse primer localization (bp)	SNP localisation (bp), Fw primer §	SNP localisation (bp), Rv primer §
NCPBP 1108	<a href="#">GCA_000177495.1</a>	648421386	1935-4352	2418	DNA gyrase/topoisomerase IV, subunit B	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	1	387-410	732-754	387, 390, 391, 393, 394, 397, 399, 400, 405, 408	732, 733, 735, 738, 741, 744, 747, 750, 751, 753
CC1458	<a href="#">GCA_000452805.2</a>	2506895564	4542-4985	444	Protein of unknown function. DUF421 domain	2	2	21-43	385-404	na	na
NCPBP 3335	<a href="#">GCA_000164015.2</a>	648877554	38103-39338	1236	Protein of unknown function. DUF1835 domain	1, 3, 7, 9, 10	3	61-80	918-937	66, 69, 72, 73, 74, 75, 78, 79	918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 933, 934, 935, 936
CC1513	<a href="#">GCA_000452765.2</a>	2506907413	8421-11348	2928	Lysyl-tRNA synthetase, class I	4	4	605-624	1470-1489	na	na
CC1417	<a href="#">GCA_000452825.2</a>	2506965122	7504-8115	612	Chemotaxis like protein	9	9	41-60	450-469	na	na
CC1466	<a href="#">GCA_000452785.2</a>	2506901715	17733-18980	1248	Protein of unknown function. DUF2599 domain	1, 10	10	435-458	780-799	435, 443, 447, 448, 456, 458	780, 786, 795, 798
UB246	<a href="#">GCA_000452865.1</a>	2507270264	7514-9898	2385	Alpha-glucosidase, glycosyl hydrolase family GH31	13	13	599-618	1201-1220	na	na

\* Range of the gene that was used to design the primer pairs.

† Phylogroup in which the gene was present as single copy.

‡ The given gene was used to develop specific primers for the phylogroups listed in the table.

§ SNP localization refers to those genes that were present in more than one phylogroup.

900 ml distilled water), and 1 volume of boric acid (1.5g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> in 100 ml distilled water), and contains cycloheximide (200 mg l<sup>-1</sup>) and cephalixin (80 mg l<sup>-1</sup>). The plates were incubated at 25°C for 48-72 hours. Putative *P. syringae* isolates were identified by the morphology of the colony (size, color, reflectance of light and roughness of the colony border). These isolates were stored in a phosphate buffer. No previous data about their phylogroup affiliation were available for these isolates. Phylogroup affiliation of these isolates was verified by sequencing the *cts* gene of the corresponding purified strain of each isolate. The resulting *cts* sequences were aligned with the *cts* sequences of the strains from the *P. syringae* collection described above (1 or 2 representatives per phylogroup) by using clustalW2 software. A phylogenetic tree was constructed with the Neighbor Joining Model and 3000 bootstrap replicates by using MEGA6 software (Tamura *et al.* 2013).

Fifty-Four *P. syringae* whole genomes available on the JGI platform and representative of 10 phylogroups were used to identify genes specific for each phylogroup with the IMG/M system (<http://img.jgi.doe.gov>). The Abundance Profile Overview tool was used in order to identify unique genes specific for each phylogroup. This tool provides an overview of the relative abundance of protein families (COGs and Pfams) across the 54 selected genomes used in this study. Genes selected for primer designing are listed in Table 1. All gene sequences used in this study are available in Table S2. For Phylogroups 1, 3 and 10 no unique open reading frames or unique DNA sequences were observed. For these phylogroups, DNA regions of some genes (Table 1) were used to design primers based on single nucleotide polymorphisms (SNPs). The SNP containing region was chosen based on a high G/C content. The size of the SNPs on the forward (Fw) and reverse (Rv) primers varied from 4 to 17 bp as reported in Table 1.

**Table 2.** Primers and PCR conditions used for identification of *Pseudomonas syringae* phylogroups.

<b>Simplex PCR</b>			
<b>Primer Pairs</b>	<b>Annealing temperatures (°C)</b>	<b>Expected size (bp)</b>	<b>References</b>
<b>Psy generic <i>P. syringae</i> primers</b>			
Fcb43 ATG ATC GGA GCG GAC AAG Rcb43 GCT CTT GAG GCA AGC ACT	61	<b>144</b>	Guilbaud <i>et al.</i> 2016
<b>PG1</b>			
PG1-Fw AGA ACT TCT GTT GCT GAC AGT ACG PG1-Rv CAA TAC CGT CAT CGC GCT GGA CA	63	<b>321</b>	This study
<b>PG2</b>			
PG2-Fw AGC AGC GAT TTA TTT TGT CTT GA PG2-Rv ATG ATC GCG TAC CTG ATG TC	60	<b>341</b>	This study
<b>PG3</b>			
PG3-Fw AAG CGT GCC AAA GAG CTT CT PG3-Rv CTT GGC CGA AGG TCA TTG AC	61	<b>837</b>	This study
<b>PG4</b>			
PG4-Fw CAC CTG ACT TAC TGA TCA AT PG4-Rv ACA GGC ACG CAT ATA TCG TT	60	<b>845</b>	This study
<b>PG7 and 8 (shcF)</b>			
shcF-Fw CGA CCT GCT TTC GAT CA shcF-Rv TCA ATA CTC TGG AGA TCA G	54	<b>850</b>	Bartoli <i>et al.</i> 2014
<b>PG9</b>			
PG9-Fw CAT TGC AGG AAC TGA TGA AC PG9-Rv GGT TCA ACT CTT CGA GAC AA	58	<b>389</b>	This study
<b>PG10</b>			
PG10-Fw CAC GAC GAC CTA TAT TGA AAA AAC PG10-Rv CAG GGA CCC ATT TGC CGG TC	60	<b>324</b>	This study
<b>PG13</b>			
PG13-Fw GGA TGT TCT ACG ACA ACC TG PG13-Rv AGC TGC GAG GTG ACG TTT GA	60	<b>582</b>	This study
<b>Multiplex PCR</b>			
<b>Multiplex 1 and 2*</b>	61	see above	This study

\*The multiplex 1 PCR contains primers for PG1, PG3 and PG9, while multiplex 2 PCR contains primers for PG2, PG4 and PG13. The two multiplex PCR primer sets included the Psy primers for the detection of the whole *P. syringae* complex. The amplicon sizes for multiplex PCRs are described in the single PCR table section.



## PCR conditions and analysis of the amplicons for detection of *P. syringae* phylogroups

All primer pairs were tested individually. After verification of the specificity and the size of the amplicons, primer pairs were combined in multiplex PCRs in order to reduce the number of PCRs required to identify the phylogroups. Reaction mixes for the individual PCR were composed of 5.0  $\mu\text{l}$  of GoTaq green 5X PCR buffer (Promega, France), 1.5  $\mu\text{l}$  of a solution of 25  $\text{mmol l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\mu\text{l}$  of a mix of 25  $\text{mmol l}^{-1}$  dNTPs, 2  $\mu\text{l}$  of a mix of primers consisting of 10  $\text{mmol l}^{-1}$  Fw and Rv primers, 0.13  $\mu\text{l}$  of GoTaq G2 DNA polymerase (Promega, France) with 5 units  $\mu\text{l}^{-1}$ , and 2.0  $\mu\text{l}$  of bacterial suspension at  $10^8$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . The final volume of the PCR reaction was 25  $\mu\text{l}$  and milliQ water was used to mix dilution. All PCR amplifications were performed for 30 cycles; primer sequences and PCR conditions are listed in Table 2. Reaction mixes for the multiplex PCRs were composed of 6.25  $\mu\text{l}$  of 2X QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen® Multiplex PCR kit), 1.25  $\mu\text{l}$  of primer mix with a final concentration of 2  $\text{mmol l}^{-1}$  per primer, 1.25  $\mu\text{l}$  of Q solution, 2.75  $\mu\text{l}$  of milliQ water and 2.0  $\mu\text{l}$  of bacterial suspension at  $10^8$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . The final volume reaction for the multiplex PCR was 11.5  $\mu\text{l}$ . Taking into account the amplicon sizes (Table 2), two multiplex PCR reactions were developed: "Multiplex 1" containing the universal primer pair Psy and the primers specific for phylogroup 1 (PG1), phylogroup 3 (PG3) and phylogroup 9 (PG9) and "Multiplex 2" containing the primer pair Psy and those specific for phylogroup 2 (PG2), phylogroup 4 (PG4) and phylogroup 13 (PG13). Amplification was performed for 30 cycles and denaturation and elongation temperatures were 95°C and 72°C, respectively for all reactions. Annealing temperatures are reported in Table 2. PCR products were migrated at 80V in a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide (BET) (Euromedex, EU0070) at a concentration of 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Migration times varied

depending on the size of PCR amplicons. After migration, PCR products were visualized under ultraviolet light (320 nm).

### **Sensitivity and performance criteria**

To test the sensitivity of the multiplex PCR, different bacterial concentrations were used during PCR amplifications. These concentrations varied from  $10^8$  to  $10^4$  bacterial cells  $\text{ml}^{-1}$ .

To test the performance of the PCRs we used criteria described in previous studies (EPPO 2010; 2014; Loreti *et al.* 2014). These performance criteria are derived from those used in the development of a PCR based detection method for *P. syringae* pv. *actinidiae* (Loreti *et al.* 2014). Briefly, these criteria include i) relative accuracy (A) which corresponds to the similarity of the observed results compared to expected results, ii) diagnostic sensitivity (SE) which is the ability of the method to detect the target strain in a contaminated reference sample, and iii) diagnostic specificity (SP) which corresponds to the capacity of the method to not yield a positive result in an uncontaminated sample reference.

## **Results**

### **Eight primer pairs are sufficient to identify nine *P. syringae* phylogroups**

In this work, we developed primer pairs for the identification of 9 *P. syringae* phylogroups (1, 2, 3, 4, 9, 10 and 13). A primer pair for the detection of the *P. syringae* phylogroups 7 and 8 was developed and evaluated previously (Bartoli et al, 2014).

To detect PG1, a primer pair was developed based on the inter-phylogroup variability found

in the *gyrase B* (*gyrB*) housekeeping gene. The primer pair and the SNPs used to discriminate the PG1 strains among all the rest of the *P. syringae* phylogroups are reported in Table 1 and 2. Except for this primer pair all other primers were designed on non - housekeeping genes. The primer pair for PG1 (Table 2) was designed in the 387-754 bp region of the *gyrB* gene and amplify a fragment of 321 bp. The corresponding SNP localizations are reported in Table 1.

For PG2, a unique gene candidate (DUF421) was found in the 16 genomes used during this study. This gene codes for a protein of unknown function, according to the database of conserved protein domain families (Pfam04239). The PG2 primer pair (Table 2) was designed on the 21-404 bp region of the gene, and amplifies a fragment of 341 bp.

For PG3, a gene coding for a DUF1835 domain was found in all the available PG3 genomes and in some strains belonging to the phylogroups 1, 7, 9 and 10. This gene codes for a protein of unknown function and its domain is classed under the number pfam08874. Gene sequences for these four *P. syringae* phylogroups displayed a high degree of polymorphism. This polymorphism was used to design a specific primer pair that amplifies only PG3. The localizations of the SNPs used to design the specific PG3 primers are reported in Table 1. PG3 specific primer pair (Table 2) was developed on the 61-937 bp region of the gene and amplifies a fragment of 837 bp.

For PG4 one unique gene was found, coding for a lysine-tRNA ligase (pfam01921). The domain of this protein was only found in this *P. syringae* phylogroup. The sequences of the primer pair (Table 2) developed on the 605-1489 bp region of the gene amplify a fragment of 845 bp.

For PG9 a gene involved in bacterial chemotaxis (pfam04509) was found to be specific for all the strains in this phylogroup. The primer pair (Table 2) for this *P. syringae* phylogroup was developed on the 41-469 bp region of the gene and amplifies a fragment of 389 bp.

For PG10 strains we did not identify a specific candidate gene. Therefore, we selected a gene

**Table 3.** Specificity and sensitivity of the primers tested with individual primer pairs.

Target Phylogroups	Number of strains tested	PA	PD	ND	NA	Relative accuracy, A (%)	Diagnostic sensitivity, SE (%)	Diagnostic specificity, SP (%)
PG 1	131	24	0	1	106	99	96	100
PG 2	157	38	1	0	119	99	100	99
PG 3	132	17	0	0	115	100	100	100
PG 4	167	7	0	1	159	99	87	100
PG 9	138	14	0	0	124	100	100	100
PG 10	131	8	0	10	113	92	44	100
PG 13	191	34	1	0	157	99	100	99

PA= positive agreement, or the number of positive results obtained with a sample containing the targeted phylogroup

PD = positive deviation (false positive), or the number of positive results obtained with a sample that did not contain the targeted phylogroup

ND = negative deviation (false negative), or the number of negative results obtained with a sample that contained the targeted phylogroup

NA = negative agreement, or the number of negative results obtained with a sample that did not contain the targeted phylogroup

$$A = 100\% * [(PA + NA) / (PA + PD + ND + NA)]$$

$$SE = 100\% [PA / (PA + ND)]$$

$$SP = 100\% * [NA / (NA + PD)]$$

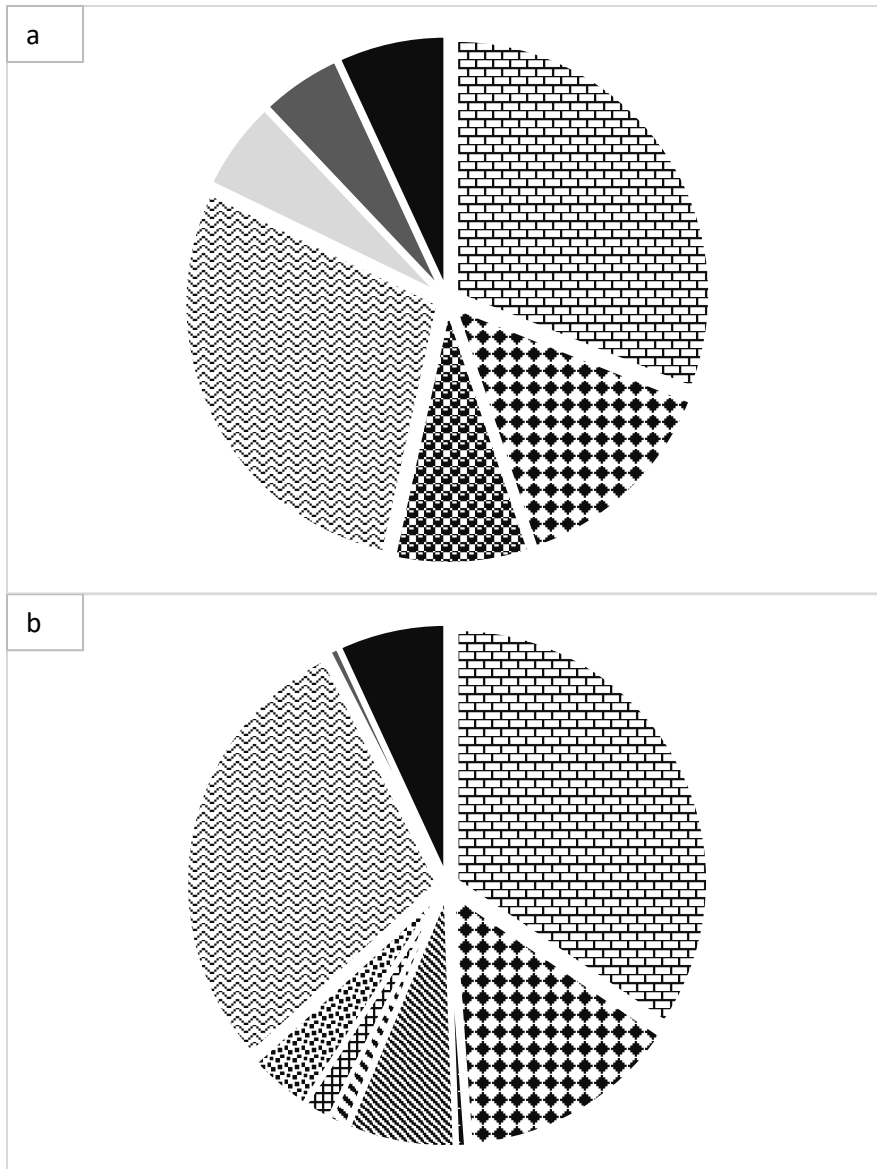
coding for a DUF2599 domain (pfam10783) present in the genome of the 3 genomes available for the PG10 as well in one strain of the *P. syringae* PG1. The PG10 specific primer pair (Table 2) was developed on the 435-799 bp region of the gene and amplifies a fragment of 324 bp. Localizations of the SNPs that were used to discriminate between the two phylogroups (PG10 and PG1) are reported in Table 1.













For PG13 several specific genes were found in the one available genome of a strain belonging to this phylogroup. The most accurate and specific primer pair targeted a gene encoding an alpha-glucosidase (pfam01055). The primer pair (Table 2) developed on the 599-1220 bp region of the gene amplifies a fragment of 582 bp.

**The primer pairs for the nine *P. syringae* phylogroups detection are specific with a high sensitivity level**

Results for the performance criteria demonstrated that the primer pairs we developed here for the detection of the nine *P. syringae* phylogroups are highly specific and sensitive (Table 3). In fact, we reported that SP is higher than 99% for all the primer pairs, indicating a high specificity level. Only one false positive PCR result was reported with the PG2 and PG13 primer pairs. All PCR results are available in Table S1. A 100% SE was obtained for the phylogroups 2, 3, 9 and 13 primer pairs, indicating a good diagnostic sensitivity. Only 1 false negative PCR result was observed for the PG1 and PG4 primer pairs. The lowest diagnostic sensitivity was observed for the PG10 primer pair, only 8 of the 18 PG10 strains were amplified.

Concerning sensitivity, *i.e.* the number of bacterial cells ml<sup>-1</sup> needed for positive PCR detection, clear bands were obtained in single and multiplex PCR on suspensions with at least 10<sup>6</sup> bacterial cells ml<sup>-1</sup>, which corresponds to 2.10<sup>3</sup> cells in the 2μl used for PCR reaction. Weak



**Figure 1.** Relative proportion of *Pseudomonas syringae* phylogroups (PG1 , PG2 , PG3 , PG7 , PG8 , PG7/8 , PG9 , PG10 , PG13  ) in kiwifruit and apricot samples from Southeastern France. Results based on the PCR primers described in this work (a) were compared with those obtained by phylogenetic analysis based on sequences of the *cts* gene (b). For some isolates the phylogroup could not be determined (Ni  ) or they were assigned to multiple phylogroups because they were composed of several strains (Mi  ). Some of the isolates tested didn't belong to the *P. syringae* species (NP  ).

bands were obtained for bacterial suspensions at  $10^5$  bacterial cells  $\text{ml}^{-1}$ .

**A blind test on putative *P. syringae* isolates from kiwifruit and apricot orchards showed the efficiency of the primer pairs in identifying PGs in natural samples**

Phylogroup affiliation of 174 putative *P. syringae* isolates from kiwifruit and apricot orchards was determined in parallel by *cts* sequencing and with the PCR method. Results based on the primer pair detection method showed the following phylogroup affiliation: i) 31% of the isolates were in *P. syringae* PG1, ii) 14% of the isolates clustered with strains of PG2, iii) 8% of the isolates were located in PG7 and 8, iv) 29% and 7% of the isolates clustered in PG13 and with different bacterial species respectively (Figure 1a). Furthermore for 5% of the isolates the phylogroup affiliation could not be determined (Ni) and in 6% of cases a multiple phylogroup identification (Mi) occurred (identification of 2 or more phylogroups for a same isolate) (Figure 1a). Through *cts* sequencing similar results were observed: i) 34% of the isolates were in the *P. syringae* PG1, ii) 14% of the isolates clustered with strains of PG2, iii) 1% of the isolates were in PG3, iv) 7% and 1% of the isolates were in PG7 and 8 respectively, v) 2% of the isolates were in PG9, vi) 4% of the isolates were in PG 10, vii) 29% and 7% of the isolates clustered with PG13 and with different bacterial species respectively, and viii) 1% of the isolates remain without phylogroup identification (Figure 1b). For the isolates whose results did not match between the primer pair detection method and the *cts* sequencing, the *cts* sequences revealed that 4%, 2%, 3% and 2% of the strains for PG1, PG2, PG7 and PG13 respectively, were misidentified. None of the 7 isolates of PG10 were detected by the PCR method, they were misidentified as belonging to PG7-8 or to PG1. PCR characterization of 10 isolates revealed that they contained mixtures of 2 or more phylogroups. Purification led to the isolation of the predicted

components of the mixture. Among the 9 isolates that could not be identified with PCR, based on the *cts* sequence of the purified strains six represented PG1, two represented PG9 and one could not be identified with the current phylogenetic classification. Twelve isolates did not belong to the species *P. syringae* according to the PCR results, and this was confirmed by sequencing the *cts* gene.

## Discussion

The PCR markers developed in this study allow rapid classification and identification of the infra-specific diversity for at least 8 *P. syringae* phylogroups (PG1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 and 13) with a high level of accuracy and for some of the strains in PG10. By coupling phylogroup-specific primer pairs to the *P. syringae* species-specific primer pair (Guilbaud *et al.* 2016) and to a sensitive selective medium (Mohan and Schaad 1987), the structure of *P. syringae* populations associated with plants and other substrates can be quantified. Quantification can be easily performed by counting the number of colonies present on the *P. syringae* selective medium. From the bacterial isolates obtained by plating, classification of the strains into the corresponding *P. syringae* phylogroups is then possible by using the primer sets proposed here.

Identifying phylogroups, with a sequencing-free molecular technique, will lead to more efficient sequencing that targets only strains for which phylogroup affiliation is not possible. Targeted sequencing could therefore be focused on the more rare phylogroups such as the phylogroup 5, 6, 11 and 12 as well as any currently unknown phylogroups that occurred in the samples. Understanding phylogroup affiliation of isolates is an important step for the identification of *P. syringae* lines implicated in a range of diseases. The method proposed here



could be then employed for epidemiological studies aiming at characterizing *P. syringae* diversity associated with diseased plants. To date, the kiwifruit epidemic is known to be caused by strains of the *P. syringae* complex that belong to PG1 (Bartoli *et al.* 2015). By using the primers developed here, one can attempt to detect strains in the *P. syringae* PG1 associated with disease on kiwifruit plants and then to confirm with more specific primers their identity with the current quasi-clonal epidemic line. In this way association of other *P. syringae* phylogroups as an important factor for disease occurrence on kiwifruit could be revealed. For example, here we revealed the presence of strains belonging to PG10 and 13 as epiphytes on ground cover plants and in buds of apricot and kiwifruit orchards. Previously these phylogroups were only observed in water and other non-plant substrates associated with the water cycle (Berge *et al.* 2014). The potential synergistic or antagonistic roles of these phylogroups in symptom manifestation is unknown and can now be explored.

Furthermore, the molecular technique described here leads to considerable time savings in light of the effort required for strain purification and preparation of DNA for sequencing. In fact, when the method is applied to isolates that have not been purified it is possible to identify mixtures of several phylogroups. However, it is not possible to determine the number of isolates of each phylogroup constituting these mixtures nor to identify mixtures of several strains of the same phylogroup.

The cases of misallocation of the phylogroups by PCR can be explained by the extreme genetic variability that exists within the *P. syringae* complex (Berge *et al.* 2014). Indeed, some strains can lose or gain genes as a result of mutation, deletion or insertion. Developing primers to identify species of the same genus or genera sharing the same functions can sometimes be difficult, and differentiating strains within a bacterial species is often even more difficult (Romero *et al.* 1995; Wang *et al.* 1997; Hallin and Lindgren 1999; Kidd *et al.* 2009; Rees-George

*et al.* 2010; Gallelli *et al.* 2014). The primer pairs described here should be used in two separate PCR protocols: two multiplexes - one to identify PG1, 3 and 9 and the second for identification of PG2, 4 and 13 - and two independent single PCRs. The first single PCRs will allow for the identification of strains in PG 7 and 8 with the specific primer pair (shcF) previously described (Bartoli *et al.* 2014). The primer pair shcF could not be incorporated into the multiplex due to incompatibility of the annealing temperatures. The second single PCR will allow the identification of strains in PG10. It was not possible to couple this last primer pair because the size of the amplicon, 324 bp, is similar to amplicons obtained for PG1 (321bp) and PG2 (341 bp).

The method described here will facilitate exploration of population structures of *P. syringae* assemblages and in particular in samples where different genetic lines co-exist and potentially interact. It will also contribute to the discovery and characterization of unknown *P. syringae* phylogroups in natural samples. With the increase in the number of available *P. syringae* genomes, improving molecular markers for *P. syringae* phylogroup detection is facilitated. The approach proposed here will open new perspectives on the importance of assemblages of genotypes of this bacterium in its survival, fitness and pathogenicity.

**Acknowledgements** This work was partially supported by a grant from the French Ministry of Agriculture (contract n° 21000480, “Amélioration des moyens de lutte contre *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae*”). The salary of B. Borschinger was provided by a scholarship from the TERSYS research federation.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Balestra, G.M., Taratufolo, M.C., Vinatzer, B.A. and Mazzaglia, A. (2013) A multiplex PCR assay for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and differentiation of populations with different geographic origin. *Plant Dis* **97**, 472-478.
- Barret, M., Briand, M., Bonneau, S., Prévieux, A., Valière, S., Bouchez, O., Hunault, G., Simoneau, P. and Jacques, M.-A. (2015) Emergence shapes the structure of the seed microbiota. *Appl Environ Microbiol* **81**, 1257-1266.
- Bartoli, C., Berge, O., Monteil, C.L., Guilbaud, C., Balestra, G.M., Varvaro, L., Jones, C., Dangl, J.L., Baltrus, D.A., Sands, D.C. and Morris, C. E. (2014) The *Pseudomonas viridiflava* phylogroups in the *P. syringae* species complex are characterized by genetic variability and phenotypic plasticity of pathogenicity-related traits. *Environ Microbiol* **16**, 2301-2315.
- Bartoli, C., Lamichhane, J.R., Berge, O., Guilbaud, C., Varvaro, L., Balestra, G.M., Vinatzer, B.A. and Morris, C.E. (2015) A framework to gauge the epidemic potential of plant pathogens in environmental reservoirs: the example of kiwifruit canker. *Mol Plant Pathol* **16**, 137-149.
- Berge, O., Monteil, C.L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D.C. and Morris, C.E. (2014) A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS one* **9**, e105547.
- Donati, I., Buriani, G., Cellini, A., Mauri, S., Costa, G. and Spinelli, F. (2014) New insights on the bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). *J Berry Res* **4**, 53-67.
- EPPO (2010) PM 7/98 (1): specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *Bull OEPP* **40**, 5-22.
- EPPO (2014) PM 7/120 (1) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Bull OEPP* **44**, 360-375.
- Gaignard, J.L. and Luisetti, J. (1993) *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Agronomie* **13**, 333-370.
- Gallelli, A., Talocci, S., L'Aurora, A. and Loreti, S. (2011) Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of bacterial canker of kiwifruit, from symptomless fruits and twigs, and from pollen. *Phytopathol Mediterr* **50**, 462-472.
- Gallelli, A., Talocci, S., Pilotti, M. and Loreti, S. (2014) Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathol J* **63**, 264-276.
- Green, S., Laue, B., Fossdal, C.G., A'Hara, S.W. and Cottrell, J.E. (2009) Infection of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* and its detection by quantitative real-time PCR. *Plant Pathol J* **58**, 731-744.
- Guilbaud, C., Morris, C.E., Barakat, M., Ortet, P. and Berge, O. (2016) Access to the diversity of *Pseudomonas syringae* populations facilitated by a PCR-based method of identification targeting the whole species complex. *FEMS Microbiol Ecol* **92**, fiv146
- Hallin, S. and Lindgren, P.-E. (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1652-1657.
- Handelsman, J. (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 669-685.

- Hirano, S.S., Charkowski, A.O., Collmer, A., Willis, D.K. and Upper, C.D. (1999) Role of the Hrp type III protein secretion system in growth of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a on host plants in the field. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 9851-9856.
- Hirano, S.S. and Upper, C.D. (1990) Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annu Rev Phytopathol* **28**, 155-177.
- Kamoun, S. and Kado, C.I. (1990) A plant-inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an exocellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhosts. *J Bacteriol* **172**, 5165-5172.
- Kawaguchi, A., Inoue, K. and Inoue, Y. (2014) Biological control of bacterial spot on peach by nonpathogenic *Xanthomonas campestris* strains AZ98101 and AZ98106. *J Gen Plant Pathol* **80**, 158-163.
- Kerr, A. and Htay, K. (1974) Biological control of crown gall through bacteriocin production. *Physiol Mol Plant Pathol* **4**, 37-44.
- Kidd, T.J., Ramsay, K.A., Hu, H., Bye, P.T.P., Elkins, M.R., Grimwood, K., Harbour, C., Marks, G.B., Nissen, M.D. and Robinson, P.J. (2009) Low rates of *Pseudomonas aeruginosa* misidentification in isolates from cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol* **47**, 1503-1509.
- King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **44**, 301-307.
- Koh, Y.J. and Nou, I.S. (2002) DNA markers for identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Mol Cells* **13**, 309-314.
- Lamichhane, J., Messéan, A. and Morris, C.E. (2015) Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *J Gen Plant Pathol* **81**, 331-350.
- Lamichhane, J.R., Varvaro, L., Parisi, L., Audergon, J.-M. and Morris, C.E. (2014) Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: seeing the forest for the trees. *Adv Agron* **126**, 235-296.
- Lamichhane, J.R. and Venturi, V. (2015) Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Front Plant Sci* **6**, 385.
- Loreti, S., Pucci, N., Gallelli, A., Minardi, P., Ardizzi, S., Balestra, G.M., Mazzaglia, A. and Taratufolo, M.C. (2014) The Italian inter-laboratory study on the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinide*. *Phytopathol Mediterr* **53**, 159-167.
- Mohan, S.K. and Schaad, N.W. (1987) An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology* **77**, 1390-1395.
- Monteil, C.L., Lafolie, F., Laurent, J., Clement, J.-C., Simler, R., Travi, Y. and Morris, C.E. (2013) Soil water flow is a source of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in subalpine headwaters. *Environ Microbiol* **16**, 2038-2052.
- Morris, C.E., Kinkel, L.L., Xiao, K., Prior, P. and Sands, D.C. (2007) Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infect Genet Evol* **7**, 84-92.
- Morris, C.E., Sands, D.C., Vanneste, J.L., Montarry, J., Oakley, B., Guilbaud, C. and Glaux, C. (2010) Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. *MBio* **1**, 107-110.
- Morris, C.E., Wen, A., Xu, X. and Di, Y.-B. (1992) Ice nucleation-active bacteria on Chinese cabbage in northern China: Population dynamics and characteristics and their possible role in storage decay. *Phytopathology* **82**, 739-746.
- Mosqueda-Cano, G. and Herrera-Estrella, L. (1997) A simple and efficient PCR method for the specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seeds. *World J Microbiol Biotechnol* **13**, 463-467.
- Moss, W.P., Byrne, J.M., Campbell, H.L., Ji, P., Bonas, U., Jones, J.B. and Wilson, M. (2007) Biological control of bacterial spot of tomato using *hrp* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Biol Control* **41**, 199-206.

- Rees-George, J., Vanneste, J.L., Cornish, D.A., Pushparajah, I.P.S., Yu, J., Templeton, M.D. and Everett, K.R. (2010) Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathol J* **59**, 453-464.
- Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M. and Lopez-Goni, I. (1995) Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* **33**, 615-617.
- Sawada, H., Suzuki, F., Matsuda, I. and Saitou, N. (1999) Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. *J Mol Evol* **49**, 627-644.
- Sawada, H., Takeuchi, T. and Matsuda, I. (1997) Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (*argK*) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *Appl Environ Microbiol* **63**, 282-288.
- Scortichini, M. (2005) The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective. *J Plant Pathol* **87**, 5-12.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725-2729.
- Vanneste, J.L. (2013) Recent progress on detecting, understanding and controlling *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a short review. *NZ Plant Prot* **66**, 170-177.
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.-F., Jacques, M.-A., Lebrun, M.-H., Le Loir, Y., Ogliastro, M., Petit, M.-A. and Roumagnac, P. (2014) Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 29
- Walker, A.W., Duncan, S.H., Louis, P. and Flint, H.J. (2014) Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends Microbiol* **22**, 267-274.
- Wang, R.F., Cao, W.W. and Cerniglia, C.E. (1997) A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J Appl Microbiol* **83**, 727-736.
- Zaccardelli, M., Spasiano, A., Bazzi, C. and Merighi, M. (2005) Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of *hrpZ*<sub>Pst</sub>. *Eur J Plant Pathol* **111**, 85-90.

### Table S1

List of strains used during this study and related information.

### Table S2

List of the gene sequences used during this study.

## Chapitre 2

---

**Etude des effets de la saison, de l'espèce fruitière cultivée,  
ainsi que de la composition des communautés végétales sur  
les populations de *P. syringae* associées aux couvre-sols  
végétaux**

## I. Contexte

Les couvre-sols végétaux sont très utilisés dans les systèmes agricoles pérennes, tels que les vergers, notamment pour les différents services rendus tels que la facilitation du passage des machines agricoles, la prévention de l'érosion du sol, l'infiltration de l'eau etc. De nombreuses études relatent des effets bénéfiques de certaines espèces ou assemblages d'espèces végétales dans la lutte contre les ravageurs des cultures, tels que des arthropodes herbivores. Cependant, il n'existe pas d'études concernant l'usage de couvre-sols végétaux dans la lutte contre les maladies causées par les microorganismes.

Le département de la Drôme, située dans le sud-est de la France, abrite de nombreux vergers d'abricotiers et de kiwis dont beaucoup sont confrontés au problème de la bactériose causée par *P. syringae*. Les pratiques de gestion de ces vergers sont très variables entre vergers et producteurs. Dans le cadre de l'étude, deux vergers d'abricotiers nommés P2 et P3, ainsi que quatre vergers de kiwis nommés K1, K2, K3, et K4, ont été sélectionnés. Les vergers P2, P3, K1 et K2 ont un couvre-sol sur les inter-rangs, mais sont désherbés à l'aide d'herbicides sur les rangs des arbres. Les vergers K3 et K4 possèdent un couvre-sol intégral, sur les inter-rangs et rangs des arbres. Les vergers P2, P3, et K4 présentaient de nombreux symptômes typiques d'une infection par *P. syringae*. Dans le cas du verger K2, des chancre et tâches foliaires typiques d'une infection par *P. syringae* étaient visibles sur certains plants de kiwis, laissant supposer une potentielle émergence de la maladie. Enfin, les vergers K1 et K3 ne présentaient aucun symptôme et paraissaient sains lors de la réalisation de cette étude.

## II. Objectif

Ce second chapitre vise à évaluer la structure des populations de *P. syringae* associées aux plantes couvre-sol de deux types de vergers différents et à différents moments de l'année, en utilisant la technique de détection moléculaire mise au point dans le chapitre 1, ainsi qu'à étudier les liens existants entre la composition des communautés de plantes couvre-sol et les populations de *P. syringae* qui y sont associées.

## III. Résultats principaux

Les couvre-sols étudiés sont composés d'une centaine d'espèces de plantes appartenant à trente familles différentes. Ceux-ci abritent des populations de *P. syringae* ayant des abondances allant de  $10^4$  à  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  de matière fraîche, et représentent entre 3 et 30 % de la communauté bactérienne totale. L'abondance absolue de *P. syringae* augmente de mars à novembre, alors que son abondance relative (proportion de *P. syringae* par rapport à la communauté bactérienne totale) diminue sur la même période. La structure des populations de *P. syringae* est fonction de la saison, de l'espèce cultivée, et des caractéristiques des communautés végétales telles que la densité de recouvrement, la richesse spécifique et la présence de certaines plantes. La présence de *Prunella vulgaris* est corrélée avec une diminution de l'abondance absolue et une modification de la structure des populations de *P. syringae*. Les résultats de cette étude laissent supposer que la gestion des couverts végétaux des vergers par ajout ou retrait de certaines espèces de plantes puisse être un levier pour moduler les communautés bactériennes qui y sont associées en augmentant le taux de bactéries non pathogènes et réduisant celui des souches pathogènes des arbres fruitiers.



## Manuscrit en cours de finalisation

# Season and plant community composition influence the size and structure of *Pseudomonas syringae* populations on orchard ground covers

Benoit Borschinger<sup>1, 2</sup>, Christelle Lacroix<sup>1</sup>, Elise Buisson<sup>2</sup>, Solène Borne<sup>3</sup>, Luciana Parisi<sup>1</sup>, Charlotte Chandeysson<sup>1</sup>, Caroline Guilbaud<sup>1</sup>, Jean-François Bourgeay<sup>1</sup>, Cindy E. Morris<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UR0407 Plant Pathology Research Unit, 84143 Montfavet, France

<sup>2</sup> Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie, IMBE, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, 84911 Avignon, France

<sup>3</sup> Station Expérimentale Fruits de Rhône-Alpes, SEFRA, 26800 Etoile sur Rhône, France

\*Corresponding author:

INRA PACA

Unité de Recherches de Pathologie Végétale, Domaine St Maurice BP 94

67, allée des Chênes, CS 60094, 84143 Montfavet cedex, France

Tel: 33 (0) 4.32.72.28.86, [cindy.morris@avignon.inra.fr](mailto:cindy.morris@avignon.inra.fr)

## Abstract

It is known that orchard ground covers can host *Pseudomonas syringae*, including strains pathogenic to fruit trees. However, it is not yet clear how the *P. syringae* populations are structured, nor how the immediate environment can affect its structure. Abundance and structure of *P. syringae* populations on ground covers in four kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) and two apricot (*Prunus armeniaca*) orchards with bacterial cankers in Southeastern France were quantified from March to November 2014. Plant community composition in orchard ground covers was also determined revealing the presence of ca. 100 plant species. *P. syringae* populations presented highly heterogeneous structures. The average bacterial density on ground cover represented about  $10^{10}$  *P. syringae* cells per kiwifruit or apricot tree and, more specifically,  $10^8$  *P. syringae* pv. *actinidiae* per kiwifruit tree. Absolute abundance of *P. syringae* on ground covers increased over time, whereas the opposite trend was observed for its relative abundance. *P. syringae* population structure was correlated to season, fruit tree type and ground cover characteristics, viz. total plant percent cover, species richness and the presence of certain plants. The presence of *Prunella vulgaris* and of plants from the Poaceae family were correlated to notable modifications of *P. syringae* abundances and population structure. The results suggest that managing orchard ground covers by influencing plant community composition could be a means to alter the associated microbial populations leading to an enhanced frequency of non-pathogenic bacteria and a concomitant reduced frequency of *P. syringae* pathogenic for fruit tree crops.

**Keywords:** *Pseudomonas syringae*, community structure, PCR, plant community, orchard, ground covers

## Introduction

Ground covers, widely used in perennial agricultural systems such as orchards, render numerous services including helping mobility of agricultural machinery when the soil is wet, preventing soil erosion by wind and water (Langdale *et al.* 1991), retaining and increasing soil nitrogen content, producing organic matter, and promoting water infiltration by avoiding soil compaction (Stewart *et al.* 1985). In addition to these various benefits, ground covers and wild vegetation bordering orchards and crops can be hosts of beneficial arthropods that enhance the potential for natural pest control (Thomas *et al.* 1991). However, ground covers can also host inoculum of various plant pathogenic microorganisms such as *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae* (Ercolani *et al.* 1974; Kishun and Sohi 1979; Morris and Knox-Davies 1980; Schaad and Dianese 1981; Kuan *et al.* 1986; Mabagala and Saettler 1992).

Drôme county (southeastern France), the site of this study, is home to many apricot and kiwifruit orchards, covering 6200 and 220 ha, respectively according to the Ministry of Agriculture, Food and Forestry (<http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/>). Almost all apricot orchards have been or are currently facing bacterial canker, caused mainly by several *P. syringae* strains (Prunier and Cotta 1987), that belong to phylogroups 1, 2, 7 and 8 as defined by Berge *et al.* (Berge *et al.* 2014). In addition, it is also one of the regions of emergence of bacterial canker of kiwifruit in France caused by *P. syringae* (*P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), phylogroup 1) (Scortichini *et al.* 2012; Berge *et al.* 2014; Vanneste *et al.* 2014).

*P. syringae* is a ubiquitous environmental bacterium, found in aquatic, agricultural and non-agricultural habitats, where it can have both saprophytic and pathogenic behavior (Hirano and Upper 1990; Gagnard and Luisetti 1993; Morris *et al.* 2007; Morris *et al.* 2008; Monteil *et al.* 2012; Monteil *et al.* 2013), and whose strains have been, at present, classified into 23 clades

within 13 phylogroups (Berge *et al.* 2014). *P. syringae* population sizes tend to increase during the spring, and may be associated with visual symptoms on trees (*e.g.* leaf spots, wood canker, bud necrosis...), decrease during the summer until reaching undetectable levels, then increase again with lower temperatures and rain events in autumn (Crosse 1957, 1966; Sundin *et al.* 1988). Through the winter, *P. syringae* can be found in dormant buds of certain tree species (Crosse 1956; Burr and Katz 1984; Roos and Hattingh 1986a; Bedford *et al.* 1988; Sundin *et al.* 1988). Likewise, *P. syringae* populations of buds and twigs from lilac, linden, magnolia, dogwood, aspen, Japanese pear and maple, decreased to undetectable levels during the winter months and increased again in the spring in orchards and nurseries in the Pacific Northwestern part of the US (Baca and Moore 1987a).

In addition to the low-level or undetectable populations of *P. syringae* within tree tissue, inoculum sources external to the tissues of the trees are likely to contribute to the dynamics of *P. syringae* populations early in spring. Among these external sources are orchard ground covers and weeds. Previous studies have identified herbaceous species as hosts of *P. syringae* (English and Davis 1960; Davis and English 1969) and demonstrated the presence of *P. syringae* on ground covers and weed species from orchards throughout the different seasons (Latorre and Jones 1979; Roos and Hattingh 1986b; Baca and Moore 1987b; Malvick and Moore 1988a, b). Moreover, more than half of the *P. syringae* isolates collected from ground covers in pear and maple plantations were pathogenic on seedlings of the respective tree species in controlled conditions. Furthermore, vertical bacterial flow between ground covers and trees was shown to be possible, corroborating the hypothesis that ground covers can be a source of inoculum for fruit trees (Malvick and Moore 1988a, b).

Despite the potential role of orchard ground covers as reservoirs of pathogenic bacteria, there is no clear understanding of the environmental drivers of bacterial abundance and community

structure on these orchard ground covers. Specifically, how the characteristics of the plant communities that constitute ground covers might affect the population abundance and structure of *P. syringae* populations associated with ground covers is unknown. Ecological engineering of species composition of orchard ground covers is already used to control various arthropod pests (Bugg 1991, 1992; Liang and Huang 1994; Douglas *et al.* 2000; Simon *et al.* 2010; Mitsch 2012). However, the question of controlling plant pathogenic microorganisms via the management of the plant composition of ground covers has generally been overlooked. The average abundance of *P. syringae* is known to vary across plants (Hirano and Upper 2000) and some plants have demonstrated bactericidal activity (Deans and Ritchie 1987; Nychas 1995), and could potentially influence the microbial populations in their immediate environment. The role of plant community characteristics; in particular host abundance, diversity and host community composition; on parasite abundance, has been the focus of many investigations and debate (Tilman 1997; Keesing *et al.* 2010; Randolph and Dobson 2012; Vourc'h *et al.* 2012; Johnson *et al.* 2015), and in some cases, concern natural unmanaged plant systems in particular (Knops *et al.* 1999; Mitchell *et al.* 2002; Haas *et al.* 2011; Lacroix *et al.* 2015). Deciphering the role of plant community characteristics of ground covers on *P. syringae* population size and structure could yield important insights into potential means for managing these bacterial populations in orchards.

To assess the potential effects of plant ground cover diversity on *P. syringae* populations size and structure, we assessed *P. syringae* populations associated with ground covers of two apricot (*Prunus armeniaca*) and four kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) orchards in Drôme county during the 2014 growing season. *P. syringae* population size and structure were compared to the composition of the ground cover plant communities to identify potential effects of certain plant species or assemblages of plant species on the structure of *P. syringae* populations.

## Materials and Methods

### Location and description of the orchards

All orchards surveyed in this study were located in Drôme county, southeastern France. They will be referred to as K1, K2, K3, K4, P2 and P3 for the four kiwifruit and two apricot orchards, respectively.

Orchards K1, K2, P2 and P3, had a ground cover between tree rows and were chemically weeded in tree rows. Orchards K3 and K4 had a ground cover both in and between tree rows. Kiwifruit orchard ground covers were mowed one to three times a year, resulting in very high and dense ground covers during the summer months. Apricot orchard ground covers were kept short throughout the year by regular mowing, with a height rarely exceeding a dozen centimeters.

Sprinkler irrigation was abundant, regular and localized in kiwifruit orchards, whereas in apricot orchards irrigation was irregular and less abundant. Furthermore, kiwifruit vines were intermingled in and between rows and ended up touching the ground cover in summer. This configuration led to high hygrometry under the kiwifruit canopy.

All the orchards were visually inspected for development of symptoms characteristic of *P. syringae*. Kiwifruit orchards K1 and K3 were healthy, *i.e.* there was absence of visible symptoms on stems and leaves at the time of this study. In orchard K2, cankers and angular leaf spots, indicative of canker caused by Psa, were visible on some kiwifruit vines,

**Table 1.** Summary of sampling dates for microbial characterization in kiwifruit and apricot orchards.

<b>Cultivated species</b>	<b>Date of sampling for microbial characterization</b>	<b>Time code</b>	<b>Plant community composition</b>
Kiwifruit	1 and 2 April 2014	T1	No
	24 May 2014	T2	Yes
	24 November 2014	T3	No
Apricot	10 and 11 March 2014	T1	No
	2 and 3 June 2014	T2	No
	23 October 2014	T3	No
	2 June 2015	T4	Yes

foreshadowing a possible serious emergence of bacterial canker in this orchard. Orchard K4 was severely affected by bacterial canker, with presence of mild to advanced symptoms on all kiwifruit vines. Both apricot orchards were seriously affected by bacterial canker and many trees had symptoms, *i.e.* cankers on stems and branches, and a non-negligible rate of mortality. Mortality mainly affected young trees, especially in orchard P2 during the first year of planting

### **Quantitative isolation of *P. syringae* from ground covers**

Multiple samples were taken over the growing season. The dates of sampling for microbial characterization are reported in Table 1.

*P. syringae* was isolated from ground cover in replicate sites in each orchard, and 5 and 9 replicate sites in each kiwifruit and apricot orchard, respectively. Each site was next to a randomly chosen tree and was marked so that, over time, samples could be collected from the same sites. Bulk ground cover samples were collected by using scissors sterilized with alcohol between each sample. A ground cover sample comprised about 10 g of leaves randomly cut from the different plant species at the sampling point. The exact weight was determined in the laboratory during sample processing. The weighed samples were stomached for 4 minutes in 50 ml sterile phosphate buffer. The washing buffer and 10-fold dilutions were then plated on two culture media: 10 % TSA with cycloheximide (3 g tryptone soy broth and 15 g of agar in 1 L of distilled water, 50 mg L<sup>-1</sup> cycloheximide) used to assess the size of the total culturable bacterial community, and modified King's B medium (KBC) for the specific isolation of *P. syringae* (King *et al.* 1954; Mohan and Schaad 1987). KBC as used in this study was composed of 9 volumes of King's B medium (KB) with a smaller quantity of proteose



peptone than the original recipe (1.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 15 g proteose-peptone, 10 mL glycerol and 15 g agar in 900 mL distilled water), and 1 volume of boric acid (1.5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> in 100 mL distilled water), and contained cycloheximide (50 mg L<sup>-1</sup>) and cephalixin (80 mg L<sup>-1</sup>). The culture media were incubated at 25°C for 48 - 72 hours. For each sample 30 putative *P. syringae* colonies based on morphological criteria of the colonies such as size, color, reflection of light, and roughness of the edge of the colonies were sub-cultured on KB medium. These colonies were further characterized as described below. This procedure has been adopted to take into account the polymorphism of colonies that we have observed in other work (Berge *et al.* 2014) and to avoid underestimating *P. syringae* population sizes. Oxidase tests were performed after 24 hours of growth at 25°C, only colonies that were oxidase negative were considered as putative *P. syringae*. One isolate of each oxidase negative colony was stored in phosphate buffer and kept at 4°C. Due to the absence of purification (not needed for the following steps of characterization) the isolates could not be considered as pure culture strains, and may contain mixtures of *P. syringae* strains.

### **Phylogenetic affiliation of putative *P. syringae* isolates**

Phylogenetic affiliation of isolates was performed by PCR as described by Borschinger *et al.* (Borschinger *et al.* 2016). In some cases, when phylogenetic affiliation was not possible by PCR, assignment was performed by sequencing the housekeeping gene encoding for the citrate synthase (*cts*) as recommended by Berge *et al.* (2014). Prior to sequencing each of the isolates was purified on KB medium, and incubated at 25°C for 24 - 48 hours. The *cts* sequences obtained were aligned with *cts* sequences (1-2 representatives per phylogroup) from the *P. syringae* research collection of the laboratory as described by Berge *et al.* (2014) using Muscle

software available on <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/> (Edgar 2004). Phylogenetic trees were created with MEGA6 software (Tamura *et al.* 2013), using the Neighbor Joining method and 3000 bootstrap replicates as described in Berge *et al.* (2014).

### **Identification of *P. syringae* pv. *Actinidiae* (Psa)**

The kiwifruit pathogen Psa belongs to phylogroup 1 (Berge *et al.* 2014). Therefore, all isolates from kiwifruit and apricot orchard ground covers affiliated to phylogroup 1 on the basis of phylogroup-specific PCR were tested in an additional PCR to determine if they were Psa with specific primers (Rees-George *et al.* 2010).

### **Plant community composition in ground covers**

Along with the second microbial sampling (T2) in kiwifruit and the fourth sampling (T4) in apricot orchards, *i.e.* between late May and early June when the plants were developed enough to be identifiable, we also estimated the percentage of the area (thereafter referred to as percent cover) covered by leaf litter, bare ground and by each plant species in multiple 1 m<sup>2</sup> squares. Percent cover of each plant species was estimated independently, so that total summed cover exceeds 100 % in quadrats that have multilayer canopies. In light of the apparent species diversity in the orchards, 10 and 20 replicate squares were analyzed in the apricot and kiwifruit orchards, respectively. The different quadrats were randomly positioned nearby the area of the ground cover sampled for *P. syringae* quantification.

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using R version 3.2.2 (R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria) (Team 2013).

We tested the effect of various environmental factors on changes in i) the absolute abundance of *P. syringae* (expressed as  $\log_{10}$  CFU per gram of fresh plant material) using linear mixed-effect models (thereafter referred to as lme) in the R nlme library, ii) the proportion of *P. syringae* relative to the abundance of the total culturable bacteria community using generalized linear mixed-effect models (thereafter referred to as glmer) and a logistic regression in the R lme4 library and iii) the structure of *P. syringae* populations using Permutational Multivariate Analysis of Variance (PerMANOVA) using the adonis function in the R vegan library (McCullagh and Nelder 1989; Pinheiro and Bates 2000). The structure of *P. syringae* was analyzed as a matrix that included for each sample the abundance of bacterial isolates from each phylogroup ( $\log_{10}$  CFU per gram of fresh plant material) that was calculated relative to the absolute abundance of *P. syringae*. PerMANOVA is similar to MANOVA and redundancy analyses (Legendre and Anderson 1999; Anderson 2001; McArdle and Anderson 2001) and is an analysis of variance that compares distance matrices in which significance is determined using a permutation test. Here, we used 999 permutations and Jaccard's distance matrices. All linear and generalized linear mixed-effect models included orchard identification (ID) as a random effect to control for variation among orchards. In PerMANOVA tests, we tested models with permutations left unconstrained and models with permutations constrained to occur within orchards (*i.e.* orchard ID was treated as strata in the adonis function).

First, we evaluated the differences in the absolute abundance, the proportion and population structure of *P. syringae* overall in kiwifruit vs. apricot orchards, as well as across sampling time in each type of orchard. Secondly, we evaluated the effect of plant community characteristics

**Table 2.** List of plant species identified during plant community composition study (1/2).

<b>Genus</b>	<b>Species</b>	<b>Family</b>	<b>Life cycle (A = annual, B = biennial, P = perennial)</b>
<i>Agrimonia</i>	<i>eupatoria</i>	Rosaceae	P
<i>Alliaria</i>	<i>petiolata</i>	Brassicaceae	A
<i>Alnus</i>	<i>sp.</i>	Betulaceae	P
<i>Alyssum</i>	<i>simplex</i>	Brassicaceae	A
<i>Ambrosia</i>	<i>artemisiifolia</i>	Asteraceae	A
<i>Anagallis</i>	<i>arvensis</i>	Primulaceae	A
<i>Arctium</i>	<i>minus</i>	Asteraceae	B
<i>Arenaria</i>	<i>serpyllifolia</i>	Caryophyllaceae	A
<i>Artemisia</i>	<i>verlotiorum</i>	Asteraceae	P
<i>Atriplex</i>	<i>sp.</i>	Amaranthaceae	A
<i>Avena</i>	<i>barbata</i>	Poaceae	A
<i>Bellis</i>	<i>perennis</i>	Asteraceae	P
<i>Bromus</i>	<i>catharticus</i>	Poaceae	A/P
<i>Bromus</i>	<i>hordeaceus</i>	Poaceae	A
<i>Bromus</i>	<i>madritensis</i>	Poaceae	A
<i>Bromus</i>	<i>sterilis</i>	Poaceae	A
<i>Calamintha</i>	<i>nepeta</i>	Lamiaceae	P
<i>Calystegia</i>	<i>sepium</i>	Convolvulaceae	P
<i>Capsella</i>	<i>bursa-pastoris</i>	Brassicaceae	A
<i>Cardamine</i>	<i>hirsuta</i>	Brassicaceae	A/B
<i>Carex</i>	<i>divulsa</i>	Cyperaceae	P
<i>Catapodium</i>	<i>rigidum</i>	Poaceae	A
<i>Cerastium</i>	<i>fontanum</i>	Caryophyllaceae	B/P
<i>Cerastium</i>	<i>glomeratum</i>	Caryophyllaceae	A
<i>Chenopodium</i>	<i>album</i>	Amaranthaceae	A
<i>Chondrilla</i>	<i>juncea</i>	Asteraceae	P
<i>Cirsium</i>	<i>arvense</i>	Asteraceae	P
<i>Convolvulus</i>	<i>arvensis</i>	Convolvulaceae	P
<i>Conyza</i>	<i>canadensis</i>	Asteraceae	A/B
<i>Conyza</i>	<i>sumatrensis</i>	Asteraceae	A
<i>Crepis</i>	<i>bursifolia</i>	Asteraceae	P
<i>Crepis</i>	<i>foetida</i>	Asteraceae	B/P
<i>Crepis</i>	<i>sp.</i>	Asteraceae	na
<i>Cupressus</i>	<i>sp.</i>	Cupressaceae	P
<i>Cynodon</i>	<i>dactylon</i>	Poaceae	P
<i>Dactylis</i>	<i>glomerata</i>	Poaceae	P
<i>Daucus</i>	<i>carota</i>	Apiaceae	B
<i>Echinops</i>	<i>ritro</i>	Asteraceae	P
<i>Elytrigia</i>	<i>campestre</i>	Poaceae	P
<i>Epilobium</i>	<i>hirsutum</i>	Onagraceae	P
<i>Erodium</i>	<i>cicutarium</i>	Geraniaceae	A/B
<i>Euphorbia</i>	<i>peplus</i>	Euphorbiaceae	A
<i>Euphorbia</i>	<i>sp.</i>	Euphorbiaceae	na
<i>Festuca</i>	<i>arundinacea</i>	Poaceae	P
<i>Festuca</i>	<i>sp.</i>	Poaceae	na
<i>Fraxinus</i>	<i>sp.</i>	Oleaceae	P
<i>Galium</i>	<i>aparine</i>	Rubiaceae	A
<i>Geranium</i>	<i>dissectum</i>	Geraniaceae	A/B
<i>Geranium</i>	<i>molle</i>	Geraniaceae	A/B/P

in ground covers (recorded from late May to early June) in kiwifruit and apricot orchards on *P. syringae* population size and structure from samplings done at the same time. Specifically, for each response variable and type of orchard (*i.e.* kiwifruit and apricot), we assessed differences in *P. syringae* populations according to species richness, total plant percent cover and to the percent cover of leaf litter and bare ground within the same models. Then, we tested for changes in *P. syringae* population sizes and structure according to the percent cover of each of the most dominant plant species, and for plant families that included both annual and perennial plant species in each type of orchard, we tested for differences in *P. syringae* populations and abundance according to plant life history. Resulting p-values are summarized in Supporting Information Table 1. In all analyzes, a p-value < 0.05 was considered statistically significant. Significant results were verified by graphic visualization: results were not retained when significance was due to outliers.

## Results

The 3012 putative *P. syringae* isolates collected during this study, related information and PCR results are described in Supporting Information Table 2. About 20 % (639) of the 3012 isolates that were considered as putative *P. syringae* at the time of isolation were in fact not members of this species according to PCR results with the psy primers. Furthermore, 650 isolates that were not fluorescent on KB medium and that might have otherwise been rejected as putative *P. syringae* if this phenotype was considered as in previous studies (Morris *et al.* 2007; Morris *et al.* 2010) were in fact *P. syringae*. These non-fluorescent isolates were affiliated to phylogroups 1 (87 isolates), 2 (106 isolates), 7-8 (250 isolates), 9 (4 isolates), 13 (37 isolates), or to none of the phylogroups targeted by the multiplex primers (189 isolates)

**Table 2.** List of plant species identified during plant community composition study (2/2).

<b>Genus</b>	<b>Species</b>	<b>Family</b>	<b>Life cycle (A = annual, B = biennial, P = perennial)</b>
<i>Geum</i>	<i>urbanum</i>	Rosaceae	P
<i>Hedera</i>	<i>helix</i>	Araliaceae	P
<i>Hordeum</i>	<i>murinum</i>	Poaceae	A
<i>Hypochaeris</i>	<i>radicata</i>	Asteraceae	P
<i>Lactuca</i>	<i>serriola</i>	Asteraceae	A/B
<i>Lolium</i>	<i>perenne</i>	Poaceae	A/P
<i>Malva</i>	<i>sylvestris</i>	Malvaceae	A/B/P
<i>Medicago</i>	<i>arabica</i>	Fabaceae	A
<i>Medicago</i>	<i>orbicularis</i>	Fabaceae	A
<i>Medicago</i>	<i>polymorpha</i>	Fabaceae	A/P
<i>Medicago</i>	<i>rigidula</i>	Fabaceae	A
<i>Myosotis</i>	<i>arvensis</i>	Boraginaceae	A
<i>Oxalis</i>	<i>corniculata</i>	Oxalidaceae	A/P
<i>Papaver</i>	<i>rhoeas</i>	Papaveraceae	A
<i>Petrorhagia</i>	<i>prolifera</i>	Caryophyllaceae	A
<i>Phleum</i>	<i>pratense</i>	Poaceae	P
<i>Picris</i>	<i>echioides</i>	Asteraceae	A
<i>Plantago</i>	<i>lanceolata</i>	Plantaginaceae	A/B/P
<i>Plantago</i>	<i>major</i>	Plantaginaceae	P
<i>Poa</i>	<i>annua</i>	Poaceae	A
<i>Poa</i>	<i>trivialis</i>	Poaceae	P
<i>Polygonum</i>	<i>aviculare</i>	Polygonaceae	A/P
<i>Polygonum</i>	<i>persicaria</i>	Polygonaceae	A/P
<i>Potentilla</i>	<i>reptans</i>	Rosaceae	P
<i>Prunella</i>	<i>vulgaris</i>	Lamiaceae	P
<i>Quercus</i>	<i>pubescens</i>	Fagaceae	P
<i>Rostraria</i>	<i>cristata</i>	Poaceae	A
<i>Rubus</i>	<i>ulmifolius</i>	Rosaceae	P
<i>Rumex</i>	<i>crispus</i>	Polygonaceae	P
<i>Rumex</i>	<i>pulcher</i>	Polygonaceae	P
<i>Scorzonera</i>	<i>laciniata</i>	Asteraceae	P
<i>Senecio</i>	<i>sp.</i>	Asteraceae	na
<i>Senecio</i>	<i>vulgaris</i>	Asteraceae	A/B
<i>Setaria</i>	<i>sp.</i>	Poaceae	A
<i>Silene</i>	<i>alba</i>	Caryophyllaceae	B/P
<i>Sison</i>	<i>amomum</i>	Apiaceae	B
<i>Sonchus</i>	<i>asper</i>	Asteraceae	A
<i>Stellaria</i>	<i>media</i>	Caryophyllaceae	A/P
<i>Symphotrichum</i>	<i>squamatum</i>	Asteraceae	A
<i>Taraxacum</i>	<i>officinale</i>	Asteraceae	P
<i>Torilis</i>	<i>arvensis</i>	Apiaceae	A
<i>Torilis</i>	<i>nodosa</i>	Apiaceae	A
<i>Trifolium</i>	<i>pratense</i>	Fabaceae	B/P
<i>Trifolium</i>	<i>repens</i>	Fabaceae	P
<i>Urtica</i>	<i>dioica</i>	Urticaceae	P
<i>Verbena</i>	<i>officinalis</i>	Verbenaceae	P
<i>Veronica</i>	<i>arvensis</i>	Plantaginaceae	A
<i>Veronica</i>	<i>persica</i>	Plantaginaceae	A
<i>Vicia</i>	<i>sativa</i>	Fabaceae	A
<i>Viola</i>	<i>sp.</i>	Violaceae	P
<i>Vulpia</i>	<i>ciliata</i>	Poaceae	A
<i>Vulpia</i>	<i>myuros</i>	Poaceae	A

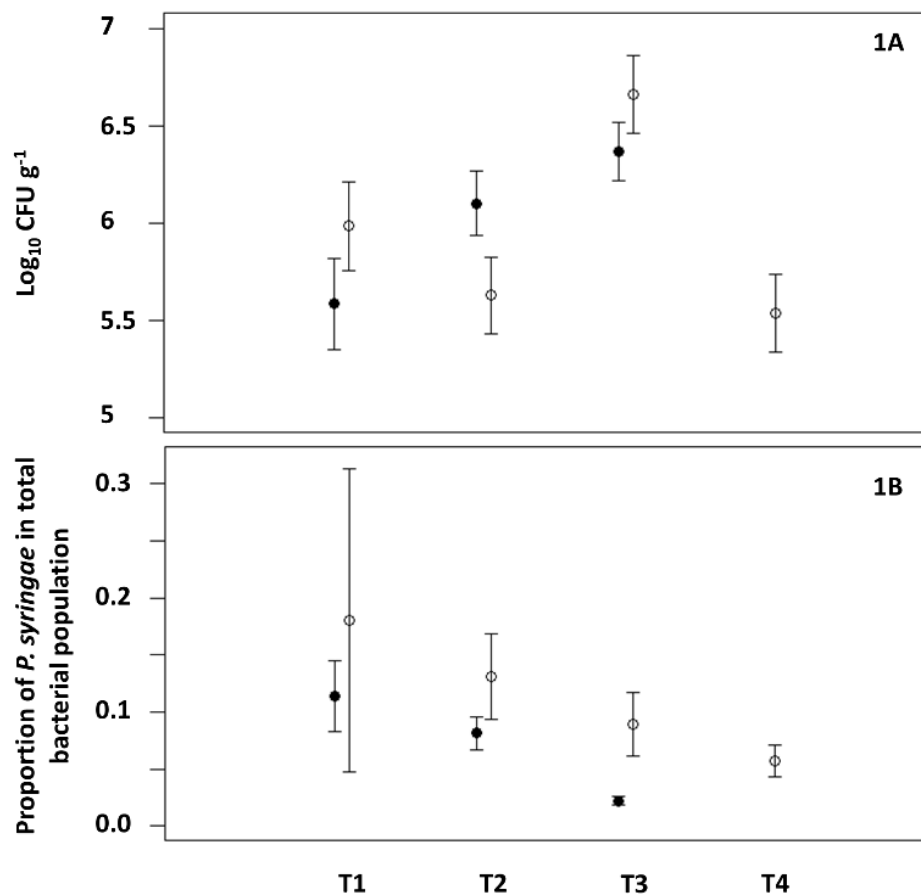
with 18 of them containing mixed cultures of two or three phylogroups. Among the 75 and 298 phylogroup 1 isolates from kiwifruit and apricot orchard ground covers, respectively, 4 were identified as Psa: three in orchard K3 and one in orchard K4. No isolates corresponding to Psa were found on the ground cover of apricot orchards.

The *cts* gene was partially sequenced from 36 *P. syringae* isolates randomly selected among isolates whose phylogroup could not be identified with our PCR protocol, coming from the third sampling date in kiwifruit orchard K4 (presenting the highest rate of unidentified *P. syringae* isolates). These sequences are presented in Supporting Information Table 2. These isolates were affiliated to phylogroups 1 (1), 8 (1), 9 (31), 10 (1), and to none of the current known phylogroups (2). About 25 % (576) of the *P. syringae* isolates still remain unidentified and will be referred to as “without phylogenetic affiliation” in the figures.

Overall, a total of 101 plant species, representing 30 families, were identified in the ground covers in kiwifruit and apricot orchards. More specifically, 82 plant species were observed in kiwifruit orchards vs. 44 in apricot orchards. All plant species identified in all orchards are listed in Table 2. Percent cover estimations for each plant species for all orchards are presented in Supporting Information Table 3.

**The absolute abundance of *P. syringae* increases on orchard ground covers whereas its relative abundance decreases over the growing season**

*P. syringae* population sizes ranged from  $10^4$  to  $10^7$  CFU  $g^{-1}$  and constituted from 3 to 30 % of the total bacterial community on kiwifruit and apricot orchard ground covers depending on the sampling date. Absolute abundance of *P. syringae* was significantly different across seasons, tending to increase over the growing season (Figure 1A). The absolute abundance of



**Figure 1.** *P. syringae* absolute (**1A**) and relative (**1B**) abundances (means and standard errors) on ground covers in kiwifruit (●) and apricot (○) orchards in Drôme county (southeastern France). T1 = 10-11 March (apricot) and 1-2 April 2014 (kiwifruit), T2 = 24 May (kiwifruit) and 2-3 June 2014 (apricot), T3 = 23 October (apricot) and 24 November 2014 (kiwifruit) and T4 = 2 June 2015 (apricot).

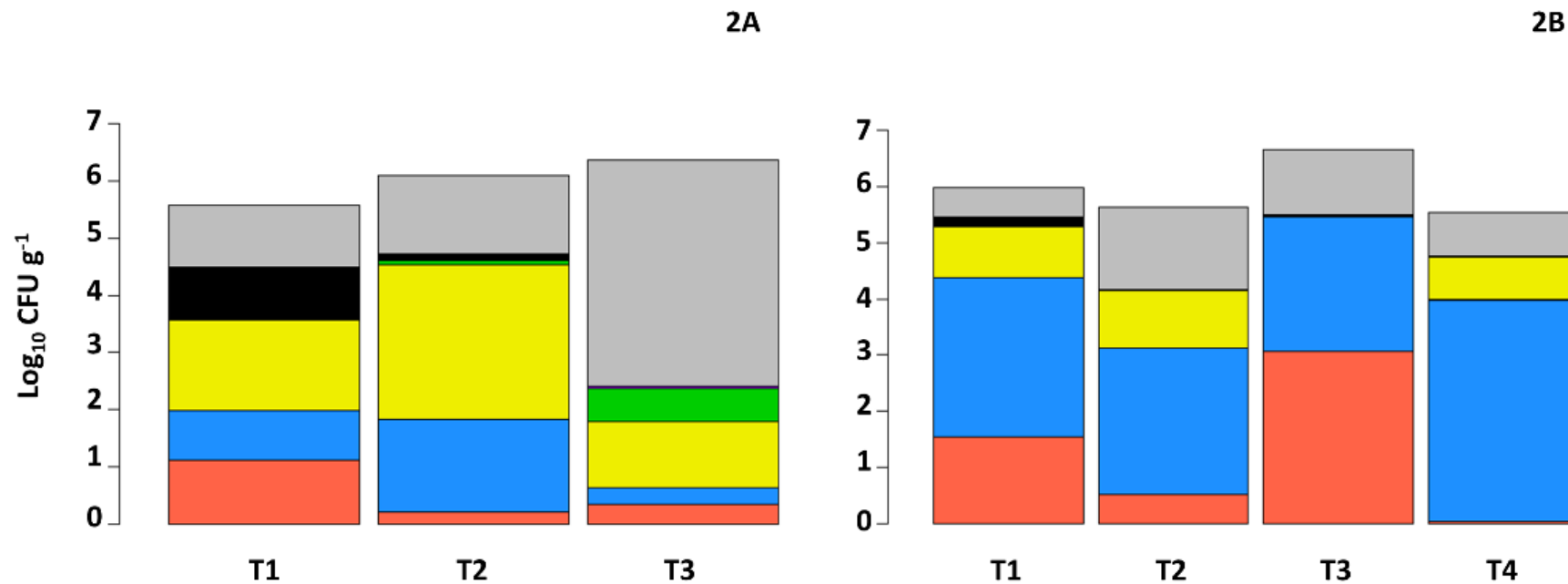


*P. syringae* populations on kiwifruit orchard ground covers was marginally yet significantly higher during the second sampling (T2) (lme, p-value = 0.05) and third sampling in the late season (T3) (lme, p-value = 0.004) compared to the first sampling (T1) (Figure 1A). The *P. syringae* populations from apricot orchard ground covers were of similar size during the first two samplings (T1, T2) (lme, p-value > 0.05), and significantly higher during the third sampling (T3) compared to the first one (T1) (lme, p-value = 0.01) (Figure 1A). On the other hand, relative abundance of *P. syringae* in the total bacterial community had the opposite trend, decreasing over the growing season (Figure 1B). Nevertheless, the effect of time on relative abundance was only significant for the third sampling (T3) during the late season relative to the first one (T1) on kiwifruit orchard ground covers (glmer, p-value = 0.01).

There was no significant difference in absolute, nor in relative *P. syringae* population sizes (lme, p-value > 0.05, and glmer, p-value > 0.05) overall on ground covers in kiwifruit vs. apricot orchards.

### ***P. syringae* population structure on ground covers differs across season, among orchard type (kiwifruit vs. apricot) and between orchards of the same crop species**

*P. syringae* population structure was different on ground covers overall in kiwifruit (Figure 2A) vs. apricot (Figure 2B) orchards (permanova, p-value = 0.001) and across time within each type of orchard (permanova, p-value = 0.001) in permanova tests in which permutations were left unconstrained. These differences in *P. syringae* population structure remained significant when permutations were constrained to occur within orchards (permanova, p-value = 0.001 and p-value = 0.001, respectively).



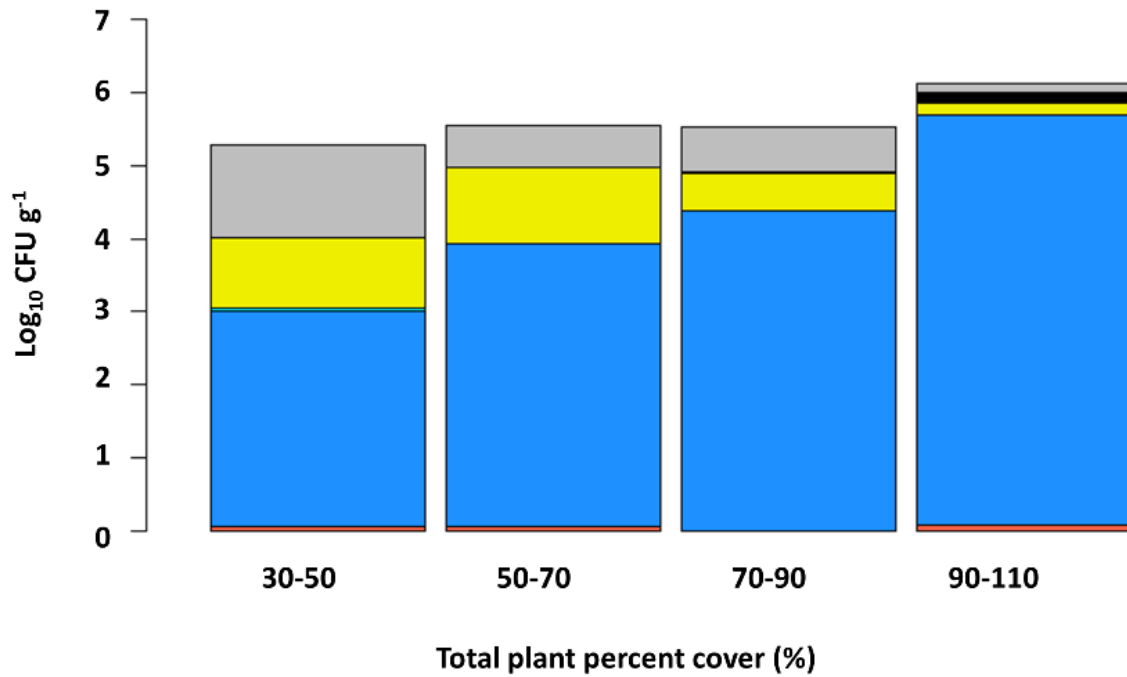
**Figure 2.** Size and structure of *P. syringae* populations on ground covers in kiwifruit (**2A**) and apricot (**2B**) orchards in Drôme county (southeastern France). The heights of the bars represent the log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> of fresh matter for the entire *P. syringae* population. Population structure is indicated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population. ■ = Phylogroup 1, ■ = Phylogroup 2, ■ = Phylogroup 3, ■ = Phylogroup 7 and 8, ■ = Phylogroup 9, ■ = Phylogroup 10, ■ = Phylogroup 13 and ■ = Without phylogenetic affiliation. T1 = 10-11 March (apricot) and 1-2 April 2014 (kiwifruit), T2 = 24 May (kiwifruit) and 2-3 June 2014 (apricot), T3 = 23 October (apricot) and 24 November 2014 (kiwifruit) and T4 = 2 June 2015 (apricot).

Overall, in kiwifruit orchards phylogroups 1 and 2 were less abundant and phylogroups 7, 8, 9 and 13 were more abundant than in apricot orchards. *P. syringae* isolates that could not be attributed to a phylogroup with PCR analyses were also more abundant in kiwifruit orchards, especially at sampling date T3 (Figure 2A). As mentioned above, through phylogenetic analysis of partial sequences of the *cts* gene, we determined the identity of 36 isolates that could not be affiliated with our PCR analyses. About 85 % (31) of these isolates belonged to phylogroup 9. Additionally, one *P. syringae* phylogroup 10 and one *P. syringae* phylogroup 3 were isolated during this study; from kiwifruit orchard K4 at sampling date T3 and from apricot orchard P3 at sampling date T4, respectively.

#### ***P. syringae* relative abundance and population structure were correlated to total percent plant cover and species richness**

The absolute abundance of *P. syringae* as measured during plant community composition study was not correlated to total percent plant cover, to plant species richness, nor to the percent cover of leaf litter and bare ground. This lack of relationship between traits describing the density and diversity of plant ground cover and *P. syringae* abundance was observed both in kiwifruit and in apricot orchards (lme, p-values > 0.05).

On the other hand, some trends were observed for the relative abundance of *P. syringae*. On kiwifruit and apricot orchard ground covers, a slight but insignificant increase of *P. syringae* relative abundance was observed with increasing total percent plant cover (glmer, p-values > 0.05). Moreover, *P. syringae* relative abundance on apricot (glmer, p-value = 0.001) but not on kiwifruit (p-value > 0.05) orchard ground covers significantly and slightly increased with higher species richness. However, total percent plant cover was positively correlated with



**Figure 3.** Size and structure of *P. syringae* populations on ground covers in apricot orchards according to total plant percent cover, percentage exceeds 100 % due to multilayer canopies. The heights of the bars represent the log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> of fresh matter for the entire *P. syringae* population. Population structure is indicated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population. ■ = Phylogroup 1, ■ = Phylogroup 2, ■ = Phylogroup 3, ■ = Phylogroup 7 and 8, ■ = Phylogroup 13 and ■ = Without phylogenetic affiliation.

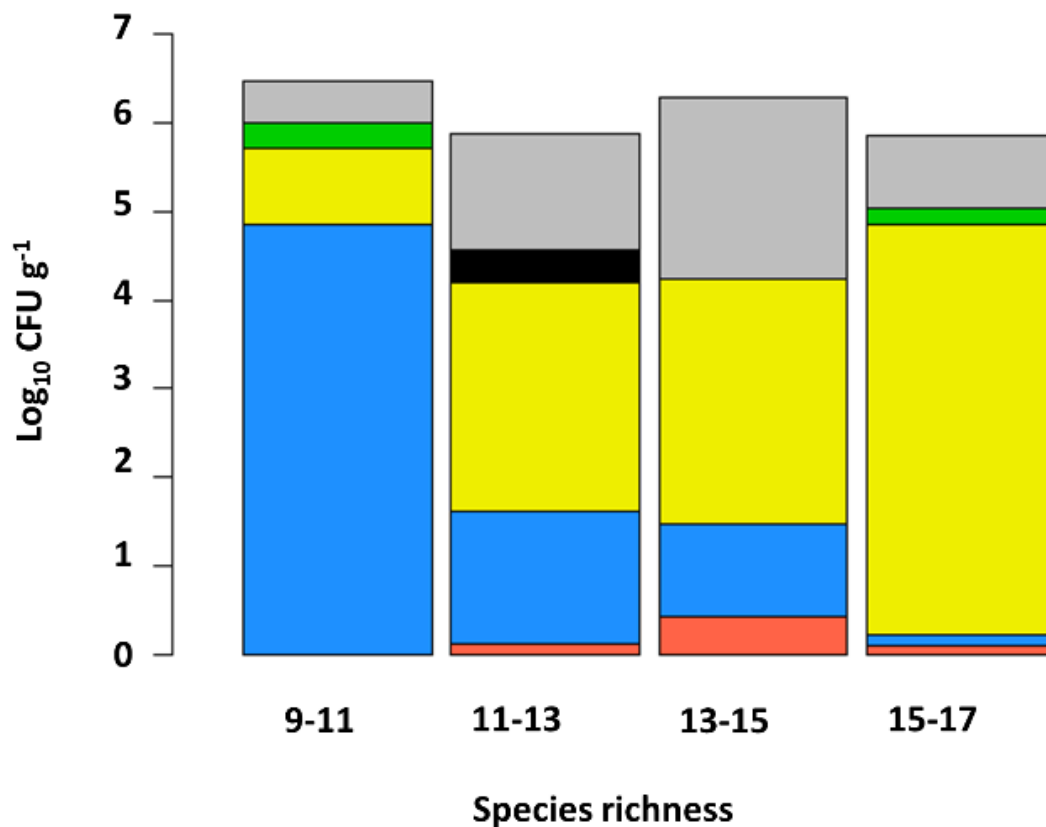
plant species richness (lm, p-value = 0.001), and the relationship between *P. syringae* relative abundance and plant species richness on apricot orchard ground covers was not robust when we controlled for variation in total percent cover (lme, p-value > 0.05).

Furthermore, on apricot orchard ground covers, *P. syringae* population structure differed marginally according to total plant percent cover (permanova, p-value = 0.05). In particular, the abundance of *P. syringae* phylogroup 2 increased with increasing total plant percent cover (Figure 3). No similar effect was observed on kiwifruit orchard ground covers (permanova, p-value > 0.05). On the other hand, on kiwifruit orchard ground covers, *P. syringae* population structure was affected by plant species richness (permanova, p-value = 0.01). In particular, increasing species richness was correlated with a decrease of phylogroup 2 and an increase of phylogroups 7 and 8 (Figure 4). This effect was not found on apricot orchard ground covers (permanova, p-value > 0.05).

#### ***P. syringae* relative abundance and population structure are correlated to Poaceae plant percent cover**

In apricot orchards (lme, p-value = 0.04, glmer, p-value = 0.01), but not in kiwifruit orchards (lme and glmer, p-values > 0.05), the absolute and relative abundances of *P. syringae* increased significantly with the total percent cover of plants from the Poaceae family. However, Poaceae plant percent cover was also positively correlated with total percent plant cover (lm, p-value = 0.04).

Separately, we tested for the effect of annual and perennial plants in the Poaceae family (glmer, p-value = 0.0004 and p-value > 0.05, respectively), revealing a positive correlation between annual Poaceae percent cover and the relative abundance of *P. syringae*



**Figure 4.** Size and structure of *P. syringae* populations on ground covers in kiwifruit orchards according to species richness. The heights of the bars represent the log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> of fresh matter for the entire *P. syringae* population. Population structure is indicated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population. ■ = Phylogroup 1, ■ = Phylogroup 2, ■ = Phylogroup 7 and 8, ■ = Phylogroup 9, ■ = Phylogroup 13 and ■ = Without phylogenetic affiliation.

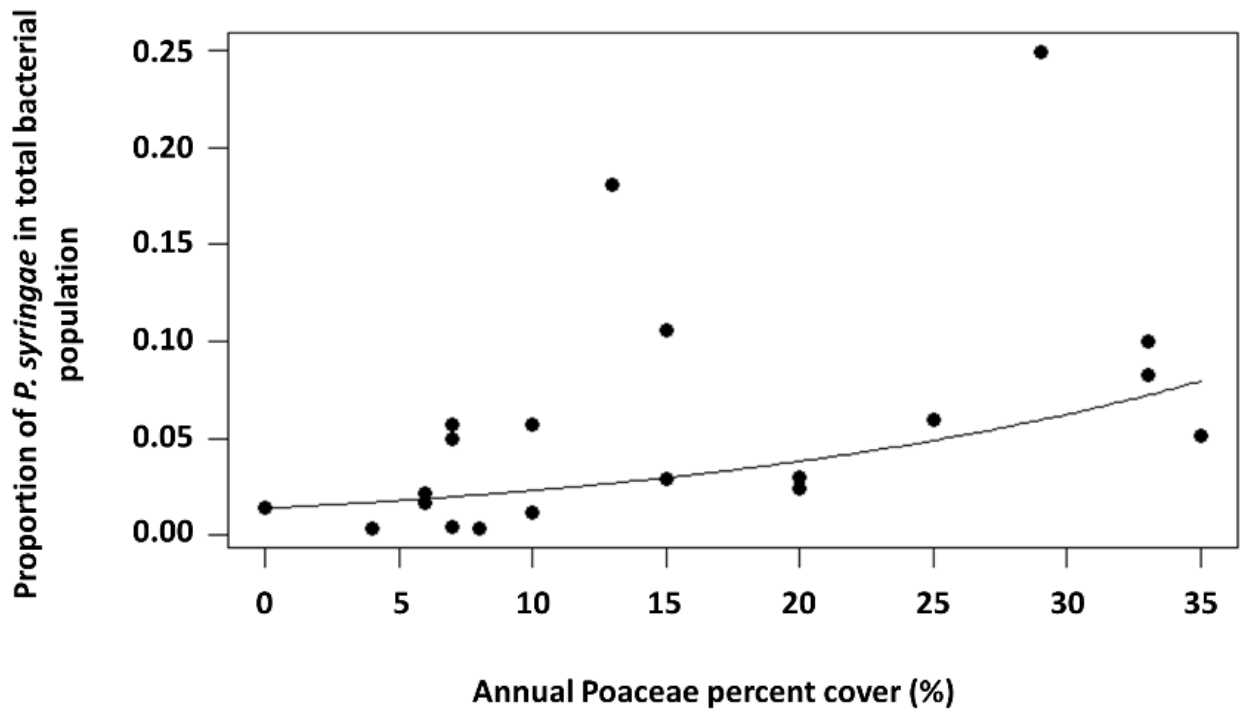
on apricot orchard ground covers (Figure 5). The percent cover of annual plants from the Poaceae family also had a significant effect on the population structure of *P. syringae* on apricot orchard ground covers (permanova, p-value = 0.01). In particular, the abundance of *P. syringae* phylogroup 2 increased with increasing annual Poaceae percent cover (Figure 6).

***P. syringae* absolute abundance decreases and its population structure is modified with increasing abundance of *Prunella vulgaris* in ground covers in kiwifruit orchards**

*Prunella vulgaris*, a perennial species of the Lamiaceae family, was present in three kiwifruit orchards: K1, K2 and K3, and its percent cover was as high as 13 % (Supporting Information Table 2). At sampling time T2, there was a significant negative correlation between *P. vulgaris* percent cover and the absolute (lme, p-value = 0.03), but not the relative (lme, p-value > 0.05), abundance of *P. syringae* on kiwifruit orchard ground covers. *P. vulgaris* percent cover had also a significant effect on *P. syringae* population structure (permanova, p-value = 0.01). These trends are illustrated in Figure 7 where the absolute abundance of *P. syringae* and specifically of the size of the population represented by phylogroup 2 decreased with increasing *P. vulgaris* percent cover. *P. vulgaris* was only present in kiwifruit orchard ground covers, so this effect could not be verified in apricot orchards.

## **Discussion**

Our results show that plant community composition can significantly impact *P. syringae* population size and structure on orchard ground covers. In particular, the relative abundance of *P. syringae* in the total bacterial flora on plants in ground covers and the structure of the *P.*

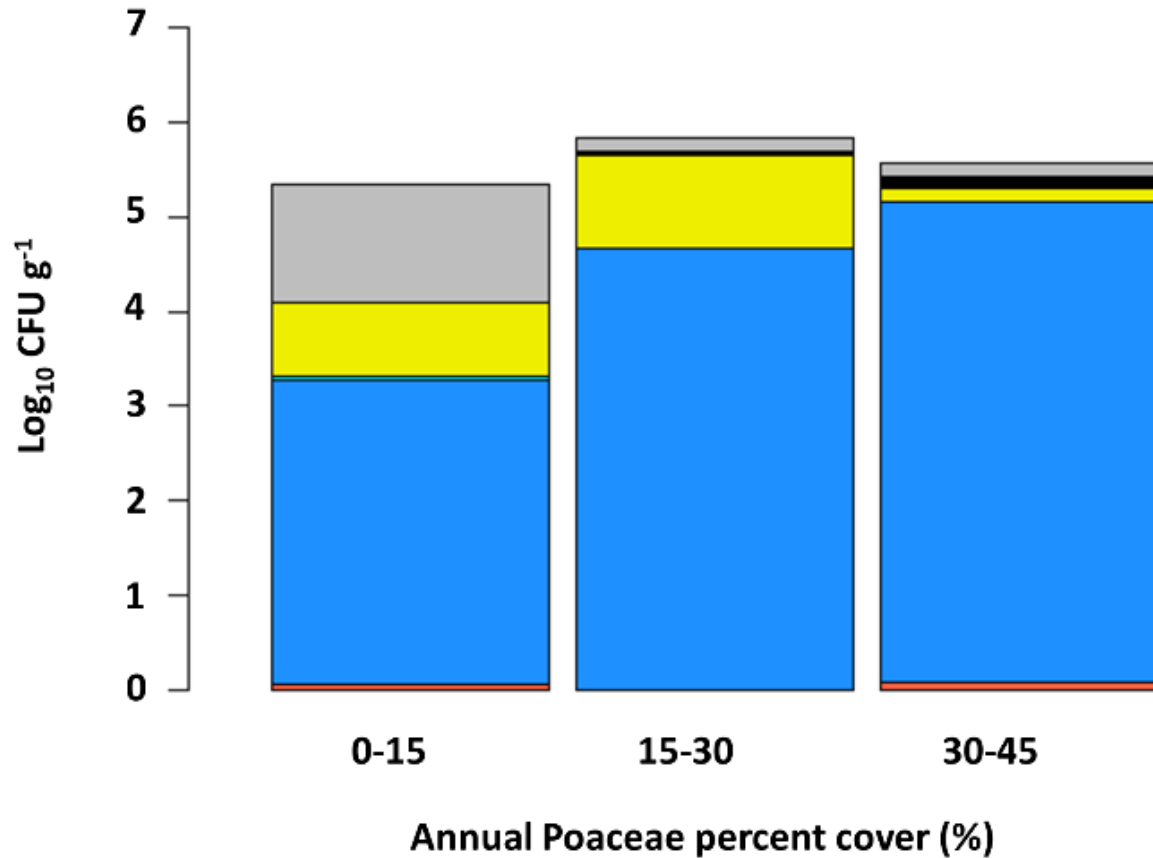


**Figure 5.** Relative abundance of *P. syringae* on apricot orchard ground covers in Drôme county (southeastern France) according to annual Poaceae percent cover.



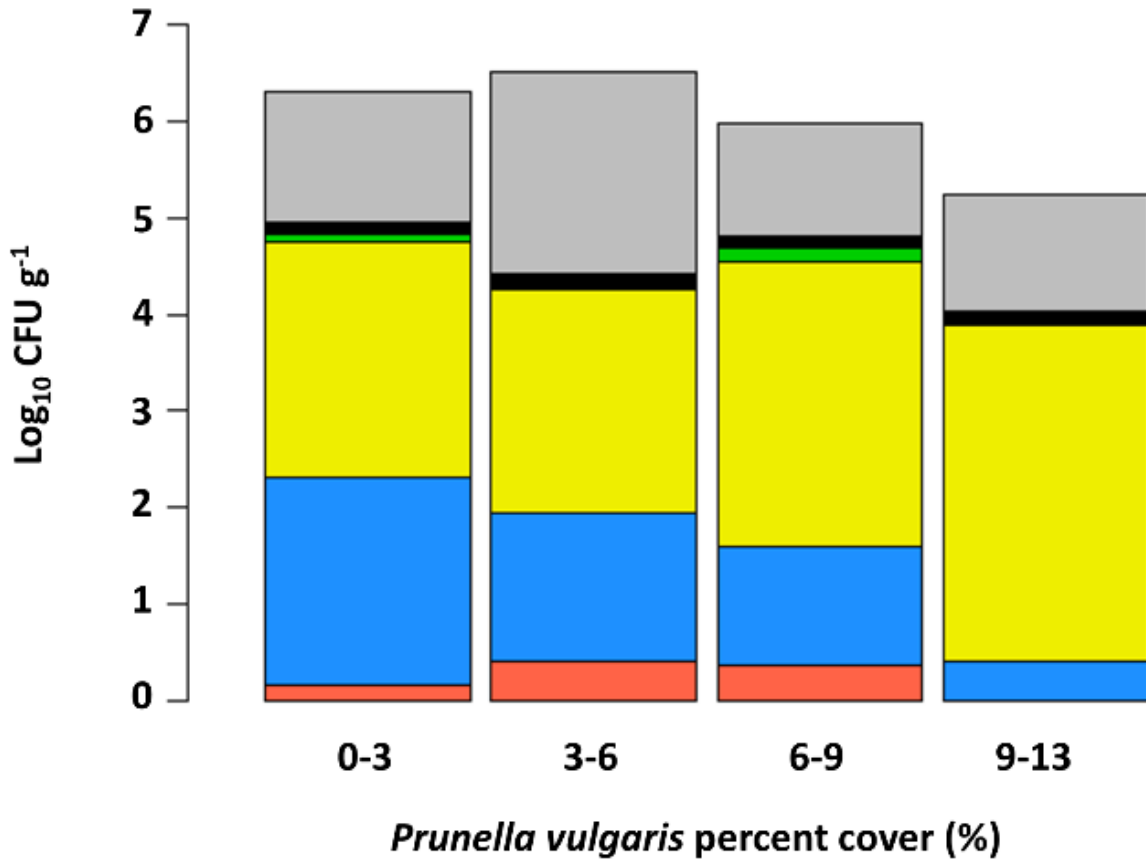
*syringae* population in terms of the relative abundance of the different phylogroups was correlated to the total percent plant cover and the plant species richness of the ground cover. We also found that the absolute abundance and the structure of *P. syringae* populations on ground covers were also correlated to the percent cover of some of the most abundant plant families and species typical of ground covers in orchards in southeastern France. These results suggest that management of *P. syringae* populations on ground covers could be achieved by changing the botanical diversity and overall density of these ground covers. If the populations of *P. syringae* on ground covers serve as sources of inoculum in orchards, such management practices could contribute to reduce the inoculum pressure.

On kiwifruit orchard ground covers, *P. syringae* absolute abundance decreased with increasing percent cover of the plant species *P. vulgaris* (Lamiaceae family). Various plant species of the Lamiaceae family, including *P. vulgaris*, are known for their antimicrobial properties (Psotova *et al.* 2003; Sarac and Ugur 2007; Kirbag *et al.* 2009). Thus, *P. vulgaris* could directly influence microbial communities on ground covers by releasing antimicrobial compounds in their immediate surroundings and perhaps especially when the ground covers are mowed. The abundance of *P. vulgaris* could also differentially alter the abundance of strains of particular phylogroups. Kiwifruit orchard ground covers were dominated by phylogroups 2, 7 and 8 whereas phylogroups 9, 13 and unidentified strains were more abundant than on apricot orchard ground covers. Both higher species richness and *P. vulgaris* percent cover in kiwifruit orchard ground covers altered *P. syringae* population structure, and correlated with a decrease in the abundance of phylogroup 2 strains and in an increase in phylogroups 7 and 8 strains. Nevertheless, it is not totally clear if plant species richness and percent cover of *P. vulgaris* both have an independent and similar effect on *P. syringae* abundance, or if one is correlated with the other (*e.g.* the higher the species richness, the



**Figure 6.** Size and structure of *P. syringae* populations on ground covers in apricot orchards according to annual Poaceae percent cover. The heights of the bars represent the log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> of fresh matter for the entire *P. syringae* population. Population structure is indicated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population. ■ = Phylogroup 1, ■ = Phylogroup 2, ■ = Phylogroup 3, ■ = Phylogroup 7 and 8, ■ = Phylogroup 13 and ■ = Without phylogenetic affiliation.

higher the abundance of *P. vulgaris*; and - if *P. vulgaris* has a direct negative effect on *P. syringae* - then the lower the *P. syringae* abundance). It would be interesting to study the reproducibility of this result in an experimental field trial to confirm this hypothesis. Disentangling the effect of total species richness and the effect of single species would require both additional samplings in more orchards and experimental field trials, but would constitute a fruitful avenue for research. Furthermore, the effect of the cultivated tree species on differences in population structure of *P. syringae* on ground covers will need to be examined. In apricot orchard ground covers, increased annual Poaceae plant percent cover was correlated with increased *P. syringae* relative abundance. This phenomenon was not observed in kiwifruit orchard ground covers. Poaceae was the most abundant family in both kiwifruit and apricot orchard ground covers. Therefore, a hypothesis to explain the contrasting effects of Poaceae could be that its impact on *P. syringae* relative abundance depends on both the total percent plant cover and on other plant species that were present in ground covers. Apricot orchard ground covers were not really dense, so a slight increase in Poaceae content could have a more notable effect on *P. syringae* populations that could be masked when Poaceae are present in a high background density of other plants species. Furthermore, in kiwifruit orchard ground covers species richness was higher, with nearly twice as many plant species as the apricot orchard ground covers (82 vs. 44 plant species, respectively), and species composition was different. This could modulate the effect of Poaceae on *P. syringae* by altering, for example, the local transmission of *P. syringae*. This higher species richness could be due to different soil types, cultural practices, naturally occurring plant species from the surrounding environment, as well as orchard ages. Furthermore, in kiwifruit orchards, abundant irrigation associated with very low and dense kiwifruit canopy promotes high hygrometric conditions which facilitate establishment and development of ground cover



**Figure 7.** Size and structure of *P. syringae* populations on ground covers in kiwifruit orchards according to *Prunella vulgaris* percent cover. The heights of the bars represent the  $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$  of fresh matter for the entire *P. syringae* population. Population structure is indicated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population. ■ = Phylogroup 1, ■ = Phylogroup 2, ■ = Phylogroup 7 and 8, ■ = Phylogroup 9, ■ = Phylogroup 13 and ■ = Without phylogenetic affiliation.

plants. Overall, *P. syringae* populations on apricot orchard ground covers were largely dominated by phylogroups 1 and 2. However, both total plant percent cover and annual Poaceae plant percent cover altered *P. syringae* population structure, and correlated with an increase in the abundance of phylogroup 2 strains. As for *P. vulgaris*, at present it is not totally clear if total plant percent cover and annual Poaceae plant percent cover have both an independent and similar effect on *P. syringae* population structure, or if one is correlated with the other.

Overall, *P. syringae* populations on kiwifruit and apricot orchard ground covers ranged from  $10^4$  to  $10^7$  CFU g<sup>-1</sup> of fresh matter and represented between 3 and 30 % of the total microbial community. These observations are similar to those made in previous studies with *P. syringae* population ranging from  $10^4$  to  $10^9$  CFU g<sup>-1</sup> of fresh matter (Ercolani *et al.* 1974; Baca and Moore 1987a; Malvick and Moore 1988a). *P. syringae* absolute population size increased over the growing season, probably to a lower degree than other bacterial species that constituted the total bacterial community on ground covers, which could explain the decrease of *P. syringae* relative abundance over the growing season. Hypotheses to explain this could be lower competitiveness for resources, or lower survival rate of *P. syringae* with increasing temperatures during the summer months compared to other bacterial species present on ground cover plants. *P. syringae* population sizes were overall not different according to orchard type, *i.e.* kiwifruit or apricot. This result is similar to the observations made by Malvick and Moore with *P. syringae* populations of similar sizes either on maple or pear orchard ground covers (Malvick and Moore 1988a).

*P. syringae* strains known to be pathogenic on kiwifruit include Psa (phylogroup 1), *P. syringae* pv. *syringae* (Pss, phylogroup 2), and *P. viridiflava* strains (phylogroups 7 and 8), the latter two are also known to be pathogenic on apricot (Wilkie *et al.* 1973; Prunier and Cotta 1987; Young

*et al.* 1988; Gagnard and Luisetti 1992, 1993; Everett and Henshall 1994; Balestra and Varvaro 1997; Rossetti and Balestra 2008; Bartoli *et al.* 2014; Berge *et al.* 2014). Psa, the causal agent of bacterial canker on kiwifruit, was detected for the first time in France in 2010 (Vanneste *et al.* 2014). No Psa was detected on apricot orchard ground covers, however four phylogroup 1 isolates from kiwifruit orchard ground covers were identified as Psa, representing about 5 % of the total phylogroup 1 population on these kiwifruit orchard ground covers and 1% of the total *P. syringae* population. The presence of pathogenic strains such as Psa on ground cover plants could be a threat if they spread to kiwifruit vines. However, the low frequency of Psa among the *P. syringae* populations on ground cover plants could indicate low competitiveness outside its host. Prior to our work two studies investigated the role of non-kiwifruit plants as reservoirs of Psa. Vanneste and colleagues showed that *Cryptomeria japonica*, plant species used as a shelter belt between blocks of kiwifruit in New Zealand, did not support Psa multiplication (Vanneste *et al.* 2012). Liu and colleagues reported that Psa survived and induced symptoms on non-kiwifruit plants surrounding the orchards (Liu *et al.* 2016). Although in our study Psa had a relatively low abundance on kiwifruit orchard ground covers, the population sizes we detected might be perceived in another light if we consider what they represent on the scale of an orchard. With an average ground cover biomass of 625 g fresh matter per m<sup>2</sup> during summer months (data not shown), 700 kiwifruit vines per hectare, and an average of  $3.9 \times 10^6$  *P. syringae* per gram of fresh matter, a one hectare kiwifruit orchard ground cover hosts up to  $2.4 \times 10^{13}$  *P. syringae* of which up to 1% can be Psa. This represents an inoculum pressure of  $3.5 \times 10^{10}$  cells of *P. syringae* across all phylogroups and  $3.5 \times 10^8$  Psa per kiwifruit plant. For apricot orchards, the mass of ground cover per ha is at most about 25% of that in kiwi orchards because of regular mowing, but trees are planted less densely (ca. 465 apricot trees / ha). Therefore, given that the abundance of *P. syringae* per gram of ground

cover is similar in apricot and kiwi orchards, the inoculum pressure of *P. syringae* per tree would still be of the same order of magnitude in both types of orchards. In this light, the epidemiological importance of weeds and ground covers as reservoirs of *P. syringae*, and of Psa in particular, needs to be clarified.

Our work provides insight that could be used for managing ground covers to reduce their importance as reservoirs of *P. syringae* pathogenic to fruit tree crops. One obvious management strategy would be to eliminate ground covers from orchards. However, this would also eliminate the multiple services that ground covers render for the production of orchard crops. Therefore, it is necessary to have criteria for choosing the appropriate plant species. In light of our results, plant species could be chosen that influence the abundance and diversity of the associated *P. syringae* populations. Plant species identified for antimicrobial properties or microbial population modulating effects could be used to modify ground cover plant communities to reduce either the abundance of *P. syringae* overall and/or the abundance of strains of certain pathogenic phylogroups. Furthermore, identification of plant species that enhance microbial abundance could be targeted and eliminated from ground covers. Although, this would require more knowledge on relative effects of species richness, total percent plant cover, effects of single plant species, and pathogenicity of strains from the various phylogroups in addition to how these effects are modulated by mowing, fertilizing and irrigation.

## **Acknowledgements**

The authors wish to thank Daniel Pavon, botanist at the Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie (IMBE, Aix-en-Provence), for his valuable help during the study of the ground

cover plant communities and plant species identification. The salary of B. Borschinger was covered by a scholarship from the TERSYS federative research structure of Avignon. The authors declare no conflict of interest.

## References

- Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 2001;**26**:32-46.
- Baca S, Moore LW. (1987a) Variations in *Pseudomonas syringae* isolated from grass species occurring in woody plant nurseries in the Pacific Northwest. *Plant Dis* 1987a;na:na-na.
- Baca S, Moore LW. *Pseudomonas syringae* colonization of grass species and cross infectivity to woody nursery plants. *Plant Dis* 1987b;**71**:724-726.
- Balestra GM, Varvaro L. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Causal Agent of Disease on Floral Buds of *Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson in Italy. *J Phytopathol* 1997;**145**: 375-378.
- Bartoli C, Berge O, Monteil CL *et al.* The *Pseudomonas viridiflava* phylogroups in the *P. syringae* species complex are characterized by genetic variability and phenotypic plasticity of pathogenicity-related traits. *Environ Microbiol* 2014;**16**:2301-2315.
- Bedford KE, MacNeill BH, Bonn WG *et al.* Population dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* on Mutsu apple. *Can J Plant Pathol* 1988;**10**:23-29.
- Berge O, Monteil CL, Bartoli C *et al.* A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS one* 2014;**9**:e105547.
- Borschinger B, Bartoli C, Chandeysson C *et al.* (2016) A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas syringae* phylogroups. *J Appl Microbiol* 2015;**120**:714-723
- Bugg RL. Cover crops and control of arthropod pests of agriculture. In *Cover Crops for Clean Water*. Ankeny, Iowa: Soil and Water Conservation Society, 1991, 157-163.
- Bugg RL. Using cover crops to manage arthropods on truck farms. *HortScience* 1992;**27**:741-745.
- Burr TJ, Katz BH. Overwintering and distribution pattern of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* and pv. *syringae* in apple buds. *Plant Dis* 1984;**68**:383-385.
- Crosse JE. Bacterial canker of stone fruits II. Leaf scar infection of Cherry. *J Horticult Sci* 1956;**31**:212-224.
- Crosse JE. Bacterial canker of stone fruits III. Inoculum concentration and time of inoculation in relation to leaf scar infection of cherry. *Ann Appl Biol* 1957;**45**:19-35.
- Crosse JE. Epidemiological relations of the pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. *Ann Rev Phytopathol* 1966;**4**:291-310.
- Davis JR, English H. Factors related to development of bacterial canker in peach. *Phytopathology* 1969;**59**:588.
- Deans SG, Ritchie G. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J Food Microbiol* 1987;**5**:165-180.
- Douglas AL, Stephen DW, Geoff MG. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. *Annu Rev Entomol* 2000;**45**:175-201.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004;**32**:1792-1797.
- English H, Davis JR. The source of inoculum for bacterial canker and blast of stone fruit trees. *Phytopathology* 1960;**50**:634.



- Ercolani GL, Hagedorn DJ, Kelman A *et al.* Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean in Wisconsin. *Phytopathology* 1974;**64**:1330-1339.
- Everett KR, Henshall WR. Epidemiology and population ecology of kiwifruit blossom blight. *Plant Pathol* 1994;**43**:824-830.
- Gaignard JL, Luisetti J. Rôle du pouvoir glaçogène dans le processus infectieux de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* et de *Pseudomonas viridiflava* sur kiwi. *Fruits* 1992;**47**:495-501.
- Gaignard JL, Luisetti J. *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Agronomie* 1993;**13**:333-370.
- Haas SE, Hooten MB, Rizzo DM *et al.* Forest species diversity reduces disease risk in a generalist plant pathogen invasion. *Ecol Lett* 2011;**14**:1108-1116.
- Hirano SS, Upper CD. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annu Rev Phytopathol* 1990;**28**:155-177.
- Hirano SS, Upper CD. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;**64**:624-653.
- Johnson PTJ, Ostfeld RS, Keesing F. Frontiers in research on biodiversity and disease. *Ecol Lett* 2015;**18**:1119-1133.
- Keesing F, Belden LK, Daszak P *et al.* Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 2010;**468**:647-652.
- King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab and Clin Med* 1954;**44**:301-307.
- Kirbag S, Zengin F, Kursat M. Antimicrobial activities of extracts of some plants. *Pak J Bot* 2009;**41**:2067-2070.
- Kishun R, Sohi HS. Two new hosts for *Xanthomonas vesicatoria* (Dooidge) Dowson. *Curr Sci* 1979;**48**:485-486.
- Knops JMH, Tilman D, Haddad NM *et al.* Effects of plant species richness on invasion dynamics, disease outbreaks, insect abundances and diversity. *Ecol Lett* 1999;**2**:286-293.
- Kuan TL, Minsavage GV, Schaad NW. Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected *Brassica campestris*. *Plant Dis* 1986;**70**:409-413.
- Lacroix C, Jolles A, Seabloom EW *et al.* Non-random biodiversity loss underlies predictable increases in viral disease prevalence. *J Royal Soc Interface* 2015, DOI: 10.1098/rsif.2013.0947
- Langdale GW, Belvins RL, Karlen DL, *et al.* Cover crops effects on soil erosion by wind and water. In: Hargrove WL (ed.). *Cover crops for clean water*. Ankeny, Iowa: Soil and Water Conservation Society, 1991, 15-22.
- Latorre BA, Jones AL. Evaluation of weeds and plant refuse as potential sources of inoculum of *Pseudomonas syringae* in bacterial canker of cherry. *Phytopathology* 1979;**69**:1122-1125.
- Legendre P, Anderson MJ. Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecol Monogr* 1999;**69**:1-24.
- Liang W, Huang M. Influence of Understory Cover and Surrounding Habitat on Interactions Between Beneficial Arthropods and Pets in Orchards Influence of citrus orchard ground cover plants on arthropod communities in China: A review. *Agr Ecosyst Environ* 1994;**50**:29-37.
- Liu P, Xue S, He R *et al.* *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated from non-kiwifruit plant species in China. *Eur J Plant Pathol* 2016, DOI: 10.1007/s10658-016-0863-4.
- Mabagala RB, Saettler AW. The role of weeds in survival of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Northern Tanzania. *Plant Dis* 1992;**76**:683-687.
- Malvick DK, Moore LW. Population dynamics and diversity of *Pseudomonas syringae* on maple and pear trees and associated grasses. *Phytopathology* 1988a;**78**:1366-1370.
- Malvick DK, Moore LW. Survival and dispersal of a marked strain of *Pseudomonas syringae* in a maple nursery. *Plant Pathol* 1988b;**37**:573-580.
- McArdle BH, Anderson MJ. Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology* 2001;**82**:290-297.
- McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. New York: CRC press, 1989.

- Mitchell CE, Tilman D, Groth JV. Effects of grassland plant species diversity, abundance, and composition on foliar fungal disease. *Ecology* 2002;**83**:1713-1726.
- Mitsch WJ. What is ecological engineering? *Ecol Eng* 2012;**45**:5-12.
- Mohan SK, Schaad NW. An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology* 1987;**77**:1390-1395.
- Monteil CL, Guilbaud C, Glaux C *et al.* Emigration of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from leaf litter contributes to its population dynamics in alpine snowpack. *Environ Microbiol* 2012;**14**:2099-2112.
- Monteil CL, Lafolie F, Laurent J *et al.* Soil water flow is a source of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in subalpine headwaters. *Environ Microbiol* 2013;**16**:2038-2052.
- Morris CE, Kinkel LL, Xiao K *et al.* Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infect Genet Evol* 2007;**7**:84-92.
- Morris CE, Sands DC, Vanneste JL *et al.* Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. *MBio* 2010;**1**:e00107-00110.
- Morris CE, Sands DC, Vinatzer BA *et al.* The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J* 2008;**2**:321-334.
- Morris MJ, Knox-Davies PS. *Raphanus raphanistrum* as a weed host of pathogens of cultivated cruciferae in the Western Cape Province of South Africa. *Phytophylactica* 1980;**12**:53-55.
- Nychas GJE. Natural antimicrobials from plants. In: Gould GW (ed.). *New Method Food Preservation*. Springer US, 1995, 58-89.
- Pinheiro JC, Bates D. *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. New York: Springer, 2000.
- Prunier JP, Cotta J. Le dépérissement bactérien (*Pseudomonas* spp.) de l'abricotier: situation en France1. *EPPO Bull* 1987;**17**:251-256.
- Psotova J, Kolar M, Sousek J *et al.* Biological activities of *Prunella vulgaris* extract. *Phytother Res* 2003;**17**:1082-1087.
- Randolph SE, Dobson ADM. Pangloss revisited: a critique of the dilution effect and the biodiversity-buffers-disease paradigm. *Parasitology* 2012;**139**:847-863.
- Rees-George J, Vanneste JL, Cornish DA *et al.* Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathol* 2010;**59**:453-464.
- Roos IMM, Hattingh MJ. Pathogenic *Pseudomonas* spp. in stone fruit buds. *Phytophylactica* 1986a;**18**:7-9.
- Roos IMM, Hattingh MJ. Weeds in orchards as potential source of inoculum for bacterial canker of stone fruit. *Phytophylactica* 1986b;**18**:5-6.
- Rossetti A, Balestra GM. (2008) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on Kiwifruit Plants: Epidemiological Traits and Its Control. In: Fatmi, M.B., Collmer, A., Iacobellis, N.S., Mansfield, J.W., Murillo, J., Schaad, N.W., and Ullrich, M. (eds.). *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008, 65-68.
- Sarac N, Ugur A. Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsian J BioSci* 2007;**4**:28-37.
- Schaad NW, Dianese JC. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathology* 1981;**71**:1215-1220.
- Scortichini M, Marcelletti S, Ferrante P *et al.* *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Mol Plant Pathol* 2012;**13**:631-640.
- Simon S, Bouvier JC, Debras JF *et al.* Biodiversity and pest management in orchard systems. A review. *Agron Sustain Dev* 2010;**30**:139-152.
- Stewart BA, MacRae RJ, Mehuys GR. The Effect of Green Manuring on the Physical Properties of Temperate-Area Soils. In: Stewart BA (ed.). *Advances in Soil Science*. New York: Springer, 1985, 71-94.
- Sundin GW, Jones AL, Olson BD. Overwintering and population dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Ps* pv. *morsprunorum* on sweet and sour cherry trees. *Can J Plant Pathol* 1988;**10**:281-288.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;**30**:2725-2729.
- Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013.
- Thomas MB, Wratten SD, Sotherton NW. Creation of 'island' habitats in farmland to manipulate populations of beneficial arthropods: predator densities and emigration. *J Appl Ecol* 1991;**28**:906-917.
- Tilman D. Distinguishing between the effects of species diversity and species composition. *Oikos* 1997;**80**:185-185.
- Vanneste JL, Moffat BJ, Oldham JM. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on *Cryptomeria japonica*, a non-host plant used as shelter belts in kiwifruit orchards. *New Zeal Plant Prot* 2012;**65**:1-7.
- Vanneste JL, Poliakoff F, Audusseau C *et al.* First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in France. *Plant Dis* 2014;**95**:1311-1311.
- Vourc'h G, Plantard O, Morand S. How Does Biodiversity Influence the Ecology of Infectious Disease? In: Morand, S., Beaudou, F., and Cabaret, J. (eds). *New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012, 291-309.
- Wilkie JP, Dye DW, Watson DRW. Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. *New Zeal J Agr Res* 1973;**16**:315-323.
- Young JM, Cheesmur GJ, Welham FV *et al.* Bacterial blight of kiwifruit. *Ann Appl Biol* 1988;**112**:91-105.

## Supporting Information

**Supporting Information Table 1.** Summary of statistical analyzes carried out and p-value outcomes.

**Supporting Information Table 2.** Summary of the putative *P. syringae* isolates collected during this study, related information and PCR results.

**Supporting Information Table 3.** Estimations of percent cover per plant species in 1 m<sup>2</sup> squares in 4 kiwifruit and 2 apricot orchards in Drôme county (southeastern France). Estimations carried out between late May and early June when the plants were developed enough to be identifiable.

## Chapitre 3

---

**Etude de l'effet de la gestion du couvert végétal sur les populations de *P. syringae* associées aux arbres fruitiers, et des liens entre les populations de *P. syringae* des plantes couvre-sol et celles des arbres fruitiers**

## I. Contexte

On sait que les plantes, et les conditions environnementales, influent sur les communautés bactériennes qu'elles hébergent. Cette variabilité est très étudiée au niveau de la phyllosphère et rhizosphère, cependant très peu d'informations existent concernant les communautés bactériennes associées aux autres organes des plantes, plus particulièrement chez les plantes ligneuses. On sait que les arbres modulent les communautés bactériennes qu'ils hébergent et que le genre *Pseudomonas* représente généralement une fraction importante de la communauté bactérienne.

*P. syringae* est responsable de l'émergence de nouvelles maladies sur plus d'une vingtaine d'espèces d'arbres fruitiers depuis le début du XXI<sup>ème</sup> siècle, dont l'épidémie récente du chancre bactérien du kiwi, causée par *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), qui a débutée en Italie en 2008 et qui s'est ensuite propagée à l'ensemble des régions productrices de kiwis dans le monde. Des populations de *P. syringae* abondantes sont présentes sur les plantes couvre-sol des vergers tout au long de l'année, et renferment des souches génétiquement proches de lignées génétiques pathogènes, laissant supposer une potentielle implication de ces couverts végétaux dans l'émergence des maladies des arbres fruitiers (réservoirs et sources d'inoculum) (voir chapitre 2).

Les sites d'étude sont les mêmes que ceux du chapitre 2, il s'agit des deux vergers d'abricotiers, P2 et P3, ainsi que des quatre vergers de kiwis, K1, K2, K3 et K4. Enfin, un troisième verger d'abricotier, nommé P1, est ajouté. Celui-ci est totalement dépourvu de couvre-sol et présente un nombre important de symptômes caractéristiques d'une infection par *P. syringae*.

## II. Objectif

Compte tenu de la complexité des facteurs intervenant dans la structuration des communautés bactériennes des arbres, ce chapitre focalise sur l'étude des populations de *P. syringae* associées aux abricotiers et aux kiwis, à l'aide des marqueurs moléculaires développés dans le chapitre 1, et la comparaison de ces populations à celles des couvre-sols du chapitre 2. L'objectif est ici de déterminer s'il existe des relations entre les populations de *P. syringae* des arbres et celles des couvre-sols végétaux, mais également si des pratiques de gestion différentes des couvre-sols influent sur les populations de *P. syringae* des arbres fruitiers.

## III. Résultats principaux

A notre connaissance il s'agit de la première étude focalisant sur la quantification de la structure génétique des populations de *P. syringae* dans des vergers. Au total plus de 1700 isolats putatifs de *P. syringae* ont été collectés à partir d'échantillons d'abricotiers et de kiwis. Les résultats montrent une très grande diversité de structure des populations de *P. syringae* entre arbres, vergers et espèces cultivées. Dans les vergers de kiwis, la présence d'un couvert végétal sur le rang des arbres est corrélée avec des populations de *P. syringae* plus abondantes sur les plants de kiwis. Dans les deux types de vergers, des *P. syringae* génétiquement proches sont présents simultanément sur les arbres et les plantes couvre-sol indiquant l'existence d'échanges verticaux entre ces deux compartiments. Sur les kiwis, *Psa* coexiste toujours en présence d'autres *P. syringae* ce qui soulève la question des interactions pouvant avoir lieu entre *Psa* et ces autres souches de *P. syringae*, et le rôle de ces potentielles interactions dans

l'émergence de la maladie. Enfin, un hypothétique antagonisme entre les phylogroupes 1 et 2 est observé dans les deux types de vergers.

**Manuscrit en cours de finalisation**

**Relationship between orchard ground cover management practices and  
*Pseudomonas syringae* populations associated with fruit trees**

Benoit Borschinger<sup>1, 2</sup>, Luciana Parisi<sup>1</sup>, Christelle Lacroix<sup>1</sup>, Elise Buisson<sup>2</sup>, Charlotte Chandeysson<sup>1</sup>,  
Caroline Guilbaud<sup>1</sup>, Jean-François Bourgeay<sup>1</sup>, Cindy E. Morris<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INRA, UR0407 Plant Pathology Research Unit, 84143 Montfavet, France

<sup>2</sup> Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie, IMBE, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR  
CNRS 7263, IRD 237, Aix Marseille Université, 84911 Avignon, France

\*Corresponding author:

INRA PACA

Unité de Recherches de Pathologie Végétale, Domaine St Maurice BP 94

67, allée des Chênes, CS 60094, 84143 Montfavet cedex, France

Tel: 33 (0) 4.32.72.28.86, cindy.morris@avignon.inra.fr



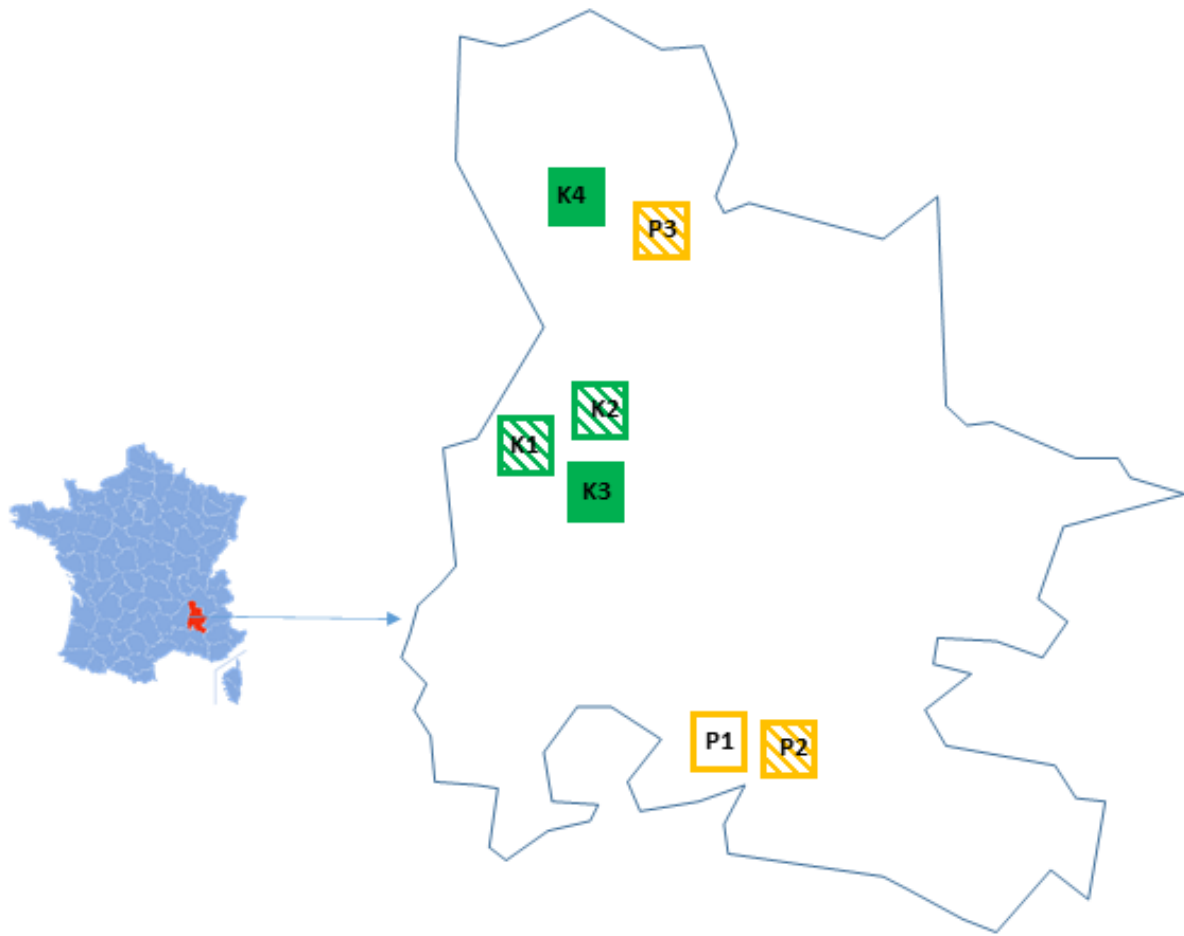
## Abstract

To our knowledge this is the first quantitative assessment of the genetic structure of *P. syringae* populations under natural conditions in orchards. This study was conducted in three apricot (*Prunus armeniaca*) and four kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) orchards located in the Drôme county, southeastern France. Various apricot and kiwifruit plant tissues were collected along the growing season 2014 taking into account phenological stages of the plants. Over 1700 putative *P. syringae* isolates were collected on the apricot and kiwifruit plants, and phylogenetic affiliation was carried out by multiplex PCR. Analyses were conducted in order to evaluate the effect of cultivated plant species and ground cover management practices on *P. syringae* population structures and abundances. Furthermore, *P. syringae* population structures and abundances on apricot and kiwifruit plants were compared to those of the ground covers characterized in a previous study in these same orchards. Finally, the presence of *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), pathogen responsible of bacterial canker of kiwifruit, was tested with a specific PCR. Results show that in kiwifruit orchards the presence of ground cover on kiwifruit plant rows enhance *P. syringae* abundances on buds compared to chemically weeded kiwifruit plant rows. Furthermore, co-occurrences of genetically similar *P. syringae* on the apricot and kiwifruit plants and the ground covers testify vertical exchanges between these two compartments. When present on kiwifruit plants, Psa was associated with other genetically different *P. syringae*, claiming the question of the role of *P. syringae* strains co-existing with Psa in disease outcome. However, in light of these results the exact role of *P. syringae* population structures and abundances on the plants in the outbreak of disease, and the directions of the exchanges between trees and grounds cover, remain unclear.

## Introduction

The contribution of plants (genotype, phenological stage, etc.) and the environment to the variability of the microbial flora among plants is well known. This has been observed for the rhizosphere (Hartmann *et al.*, 2009) and phyllosphere microflora of diverse plant species (Lindow and Brandl, 2003; Redford *et al.*, 2010; Humphrey *et al.*, 2014). Bacterial communities associated with the phyllosphere have been particularly well documented in terms of their size and dominant components (Lindow and Brandl, 2003; Vorholt, 2012), but knowledge of the community structures and the inter- and intra-specific variability on other organs, especially for trees, is limited (Meaden *et al.*, 2016). Tree species can have an important effect on associated bacterial communities, and this effect can be even greater than that of geographic distance (Redford *et al.*, 2010; Lambais *et al.*, 2014). Moreover, the bacterial communities of the phyllosphere and dermosphere from several tropical tree species were composed by up to 40 % of bacteria genetically related to the genus *Pseudomonas* (Lambais *et al.*, 2014).

*Pseudomonas syringae* is a ubiquitous bacterium, found in aquatic, agricultural and non-agricultural habitats, where it can have both saprophytic and pathogenic behavior (Hirano and Upper, 1990; Gaignard and Luisetti, 1993; Morris *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2008; Monteil *et al.*, 2012; Monteil *et al.*, 2013), and whose strains have been, at present, classified into 23 clades within 13 phylogroups (Berge *et al.*, 2014). Well known to be pathogenic to various fruit tree species, *P. syringae* has been responsible for new diseases emergence on more than 20 species of woody plants during this century (Lamichhane *et al.*, 2014). Moreover, the recent global kiwifruit canker epidemic caused by *P. syringae* pv. *actinidiae* in Italy in 2008 (Balestra *et al.*, 2009), and its subsequent spread to the rest of the kiwifruit producing areas of the world



**Figure 1.** Relative location of the three apricot (■) and four kiwifruit (■) orchards in Drôme county (southeastern France) with different ground cover management practices (□ bare ground, ▨ chemically weeded rows, ■ full ground cover).

including southeastern of France in 2010 (Vanneste *et al.*, 2014), raises concern about the rate of emergence of this disease. *P. syringae* are permanent residents of orchard ground covers all along fruit tree growing seasons, and the structures of its populations are highly variable (Latorre and Jones, 1979; Baca and Moore, 1987; Malvick and Moore, 1988a; Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2). Furthermore, *P. syringae* genetically related to the current epidemic strain of Psa were isolated from wild plants and ground covers nearby and within kiwifruit orchards (Liu *et al.*, 2016; Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2), reinforcing the idea that weeds and orchard ground covers can be reservoirs and potential sources of inoculum of *P. syringae* pathogenic to the fruit trees.

In light of the complex factors underlying the diversity of *P. syringae* associated with trees and orchards, we assessed the structures and sizes of *P. syringae* populations from apricot (*Prunus armeniaca*) and kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) plants in orchards located in the Drôme county, southeastern France and compared them to those of their respective ground covers from a previous study (Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2). Our objective was to determine if the structure and diversity of *P. syringae* populations associated with trees was correlated with the type of tree (apricot or kiwifruit), with presence of ground covers and with the structure and diversity of the microflora harbored by the ground cover.

## **Materials and methods**

### **Location and description of the orchards**

The orchards surveyed in this study were located in Drôme county, southeastern France. As in a previous study investigating the *P. syringae* population structures on ground covers in the

**Table 1.** Summary of information related to each of the studied orchards.

<b>Orchard</b>	<b>Location</b>	<b>Cultivated species</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Estimate orchard area (ha)</b>	<b>Health status</b>	<b>Ground cover management</b>
P1	Propriac-les-bains, Drôme, France	<i>Prunus armeniaca</i>	Bergeron	0,25	Diseased	Bare ground
P2	Propriac-les-bains, Drôme, France	<i>Prunus armeniaca</i>	Bergeron	0,27	Diseased	No ground cover on row
P3	Larnage, Drôme, France	<i>Prunus armeniaca</i>	Bergeron	0,21	Diseased	No ground cover on row
K1	Loriol sur Drôme, Drôme, France	<i>Actinidia deliciosa</i>	Hayward	0,44	Healthy	No ground cover on row
K2	Loriol sur Drôme, Drôme, France	<i>Actinidia deliciosa</i>	Hayward	0,4	Disease emergence	No ground cover on row
K3	Clionsclat, Drôme, France	<i>Actinidia deliciosa</i>	Hayward	0,8	Healthy	Full ground cover
K4	Châteauneuf sur Isère, Drôme, France	<i>Actinidia deliciosa</i>	Hayward	0,42	Diseased	Full ground cover

same orchards (Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2), they will be referred to as K1, K2, K3, K4, P1, P2 and P3, respectively for the four kiwifruit and three apricot orchards (Figure 1). Orchards K1, K2, P2 and P3, had a ground cover between tree rows and were chemically weeded in tree rows. Orchard P1 presented a bare ground, ground cover was removed by combining mechanical and chemical weeding. Orchards K3 and K4 had a ground cover both in and between tree rows. Apricot and kiwifruit plants were supplied with water by drip irrigation and micro sprinkler systems, respectively. Furthermore, kiwifruit vines were intermingled in and between rows and ended up touching the ground cover in summer. This configuration led to high hygrometry under the kiwifruit canopy.

All the orchards were visually inspected for development of symptoms characteristic of *P. syringae*. Kiwifruit orchards K1 and K3 were apparently healthy, *i.e.* there were no visible symptoms on stems, leaves or buds at the time of this study. In orchard K2, cankers, angular leaf spots and bud necrosis, typical of *P. syringae*, were visible on some kiwifruit vines, foreshadowing a possible serious emergence of bacterial canker in this orchard. Orchard K4 was severely affected by bacterial canker, with presence of mild to advanced symptoms on all kiwifruit vines. Apricot orchards were seriously affected by bacterial canker and many trees had symptoms, *i.e.* cankers on stems and branches, and a non-negligible rate of mortality. Mortality mainly affected young trees, especially in orchards P1 and P2 during the first year of planting. More detailed information about each orchard is summarized in Table 1.

### **Quantitative isolation of *P. syringae***

For microbial quantification, samples were collected in each orchard in 2014 in early spring (T1: 11 March for apricot and 1 April for kiwifruit), in late spring (T2: 30 April for kiwifruit and

2 June for apricot) and in autumn after harvest (T3: 20 October for apricot and 24 November for kiwifruit) and from different tissues depending on the phenological stage of the tree (Table S1). At T1 floral and vegetative buds were collected. A bulk of 10 buds was collected from each of 5 kiwifruit trees and 50 buds from each of 9 apricot trees in each orchard. At T2 kiwifruit trees still had floral and vegetative buds whereas no buds were present on apricot trees. Therefore, in kiwifruit orchards samples consisted of bulks of 10 buds from each of 5 trees and in apricot orchards they consisted of 50 leaves from each of 9 trees. At T3, after fruit harvest, most of the leaves from the apricot and kiwifruit plants had fallen therefore twigs were collected. Samples consisted of a bulk of several g of internal tissue excised from 10 twigs per each of 5 kiwifruit and 9 apricot trees per orchard as described below. Sampling focused on buds and leaves because they emerge annually and are considered to be ports of entry of *P. syringae* for subsequent infection of tissue. The tissues sampled and the amount taken were also adjusted to do the least damage to trees during the production season. Therefore, twigs were only sampled at the end of the season when no green tissues were available because numerous twigs were needed to detect *P. syringae* and we were careful to avoid pruning trees outside of the normal calendar of pruning by the growers. *P. syringae* was isolated simultaneously from apricot and kiwifruit plants and their corresponding ground covers in replicate sites in each orchard. Description of this process for ground cover samples is described in the study from Borschinger and colleagues (Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2). Apricot and kiwifruit bud, leaf and twig bulk samples were collected by using scissors, scalpel and tweezers sterilized with 70 % alcohol between each sample. Buds and leaves were put directly into sterile phosphate buffer for bacterial isolation. However, apricot and kiwifruit twigs were surface sterilized with a flame, the bark was peeled off with a sterile scalpel and only the internal tissue was kept for bacterial isolation. About 100 - 200 mg of

internal tissue was collected from each twig to make a bulk sample of 1 - 2 g per tree. The exact weight of each sample was determined before processing (Table S1). The samples were stomached for 4 minutes in sterile phosphate buffer (8.75 g  $K_2HPO_4$  and 6.75 g  $KH_2PO_4$  in 1 L distilled water). Phosphate buffer volumes were adjusted according to substrate and sample size such that the ratio of buffer (vol) to tissue (g) was 5:1 (Table S1).

Ten-fold dilutions of washings were then plated on two culture media: 10 % TSA with cycloheximide (3 g tryptone soy broth and 15 g of agar in 1 L of distilled water, 50 mg  $L^{-1}$  cycloheximide) to assess the size of the total culturable bacterial community, and modified King's B medium (KBC) for the specific isolation of *P. syringae* (Mohan and Schaad, 1987). KBC as used in this study was composed of 9 volumes of King's B medium (KB) (King *et al.*, 1954) with a smaller quantity of proteose peptone than the original recipe (1.5 g  $K_2HPO_4$ , 1.5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15 g proteose-peptone, 10 mL glycerol and 15 g agar in 900 mL distilled water), and 1 volume of boric acid (1.5 g  $H_3BO_3$  in 100 mL distilled water), and contains cycloheximide (50 mg  $L^{-1}$ ) and cephalixin (80 mg  $L^{-1}$ ). The culture media were incubated at 25°C for 48 - 72 hours. For each sample 30 putative *P. syringae* colonies based on morphological criteria of the colonies such as size, color, reflection of light, and roughness of the edge of the colonies were sub-cultured on KB medium. These colonies were further characterized as described below. This procedure has been adopted to take into account the polymorphism of colonies that we have observed in other work (Berge *et al.*, 2014) and to avoid underestimating *P. syringae* population sizes. Oxidase tests were performed after 24 hours of growth at 25°C, only colonies that were oxidase negative were considered to be putative *P. syringae*. One isolate of each oxidase negative colony was stored in phosphate buffer and kept at 4°C. Due to the absence of a purification step (not needed for the following steps of characterization) the isolates were



not considered as pure culture strains, and could have contained mixtures of *P. syringae* strains.

### **Phylogenetic affiliation of putative *P. syringae* isolates**

Phylogenetic affiliation of isolates according to phylogroups was performed by PCR as described by Borschinger and colleagues (Borschinger *et al.*, 2016). In some cases, affiliation was validated by sequencing the housekeeping gene encoding for the citrate synthase (*cts*) as recommended by Berge and colleagues (Berge *et al.*, 2014). Prior to sequencing, each of the isolates was purified on KB medium, and incubated at 25°C for 24 - 48 hours. The *cts* sequences obtained were aligned with *cts* sequences (1-2 representatives per phylogroup) from the *P. syringae* research collection of the laboratory using Muscle software available online <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/> (Edgar, 2004). The reference *cts* sequences are summarized in Table S1. Phylogenetic trees were created with MEGA6 software (Tamura *et al.*, 2013), using the Neighbor Joining method and 3000 bootstrap replicates.

### **Identification of *P. syringae* pv. *actinidiae***

The kiwifruit pathogen Psa belongs to phylogroup 1 (Berge *et al.*, 2014). Thereby, all isolates from kiwifruit and apricot plants affiliated to phylogroup 1 on the basis of PCR tests indicated above were tested in a specific PCR to determine if they were Psa. The primers used for this detection were those developed by Rees-George and colleagues (Rees-George *et al.*, 2010). Ground cover phylogroup 1 isolates had already been screened for Psa previously (Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2).

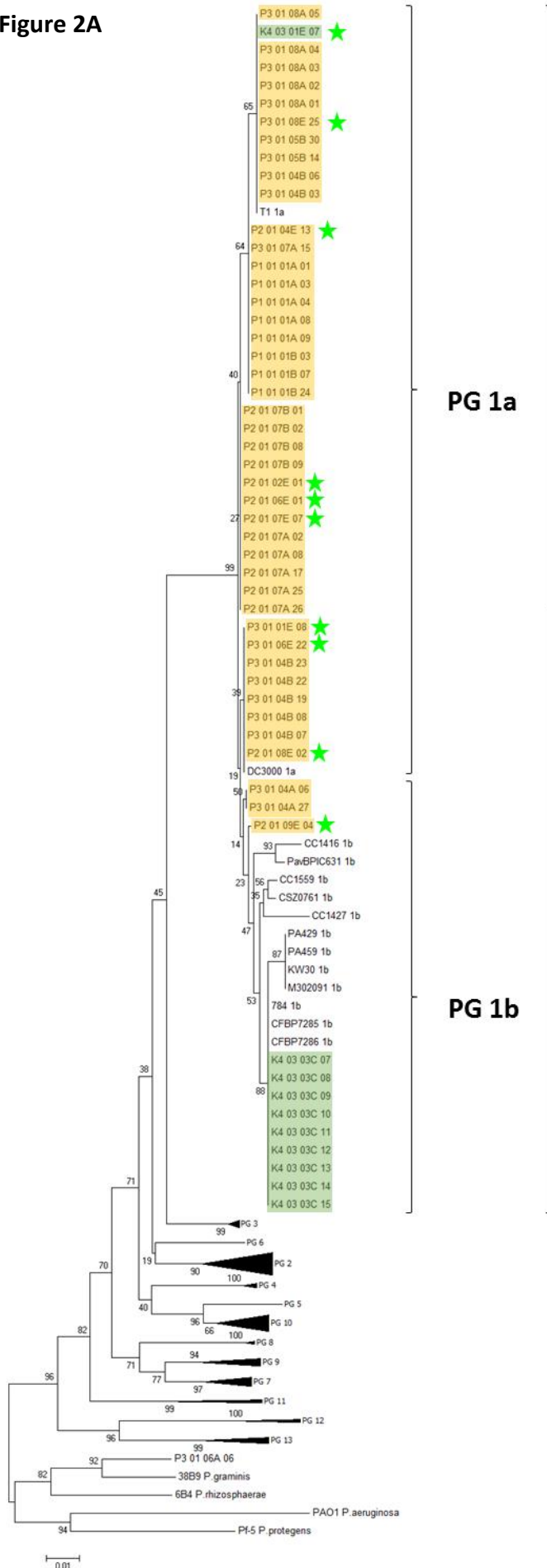
## Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R version 3.2.2 (R Core Team, 2016). We compared the *P. syringae* populations recovered from apricot and kiwifruit plants to those from their corresponding ground covers. We compared i) the absolute abundances of *P. syringae* ( $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$  of fresh plant material) using generalized linear models and a log linear regression, ii) the relative abundances of *P. syringae*, *i.e.* proportion of *P. syringae* relative to the abundance of the total culturable bacterial community, using generalized linear models and a logistic regression, and iii) the structure of *P. syringae* populations using Permutational Multivariate Analysis of Variance (PerMANOVA) using the *adonis* function in the R *vegan* library (McCullagh and Nelder, 1989; Pinheiro and Bates., 2000). The structure of *P. syringae* was analyzed as a matrix that included for each sample the abundance of bacterial isolates from each phylogroup ( $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$  of fresh plant material) PerMANOVA is similar to MANOVA and redundancy analyses (Legendre and Anderson, 1999; Anderson, 2001; McArdle and Anderson, 2001) and is an analysis of variance that compares distance matrices in which significance is determined using a permutation test. Here, we used 999 permutations and Jaccard's distance matrices. In PerMANOVA tests, we tested models with permutations left unconstrained and models with permutations constrained to occur within orchards, *i.e.* orchard identification was treated as strata in the *adonis* function.

*P. syringae* population structures on orchard ground covers and on apricot and kiwifruit plants were also analyzed with a principal component analysis (PCA) using the Pearson correlation coefficient to visually explore potential correlations in the abundances of the different phylogroups present in collected samples (Jolliffe and Morgan, 1992).

In all analyzes, a p-value < 0.05 was considered statistically significant. Significant results were

Figure 2A



verified by graphic visualization: when outliers were observed, statistical tests were performed again without the outliers in order to determine their influence on the significance of the results.

## Results

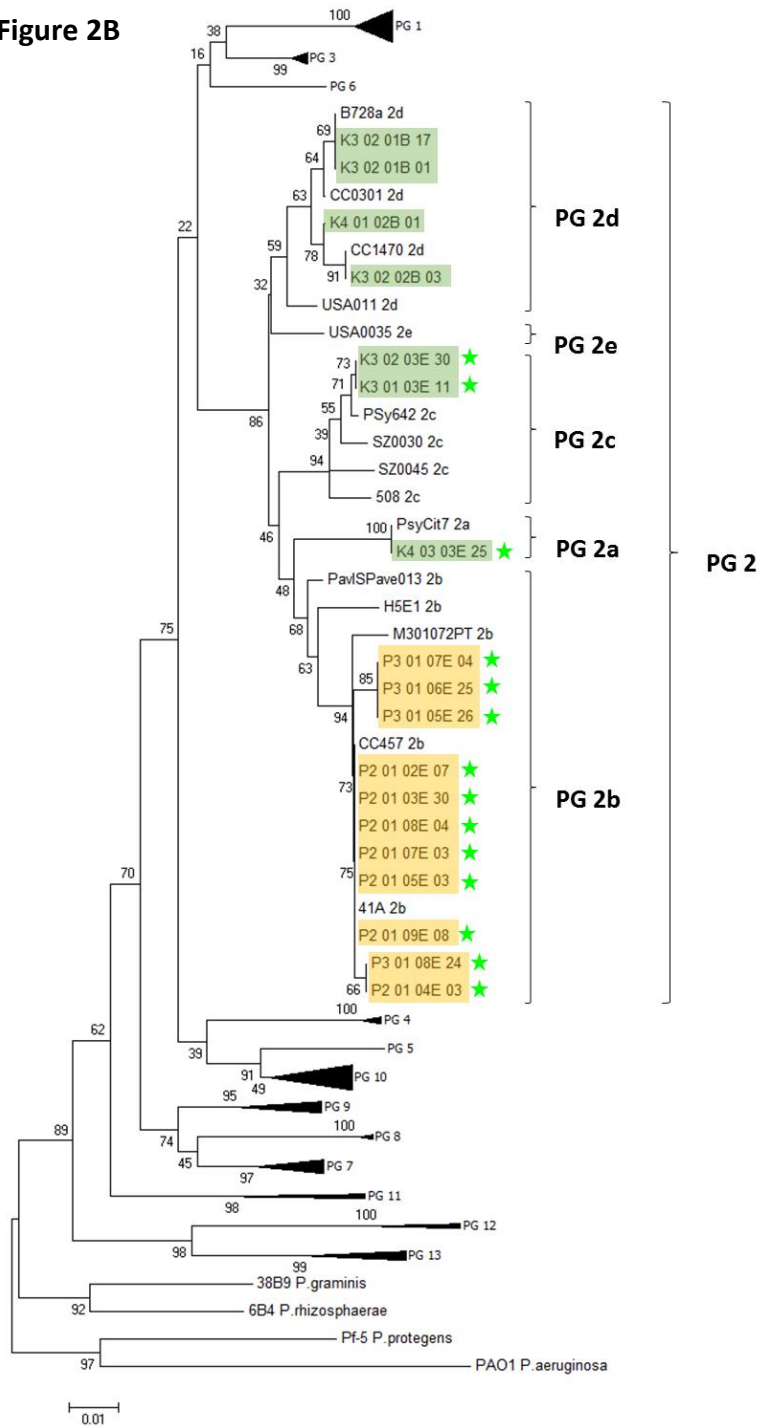
### Phylogenetic characteristics of *P. syringae* isolates

Overall 4167 putative *P. syringae* isolates, 2100 from apricot and 2067 from kiwifruit orchards, were used in this study. Among these 4167 isolates, 2459 were collected on ground covers and had been characterized previously (Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2), the remaining 1708 isolates were collected from apricot and kiwifruit plants and reported for the first time in this study (856 and 852 from apricot and kiwifruit plants, respectively). All isolates are summarized in Table S1.

In addition to the 36 *cts* sequences obtained previously (Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2), 156 *cts* sequences were added to confirm the identity of some isolates: 110 from kiwifruit and 82 from apricot orchards (Table S1). They were affiliated to phylogroups 1 (55), 2 (22), 3 (1), 7 and 8 (11), 9 (36), 10 (8), 13 (51), and to none of the current known phylogroups (7). One isolate was not *P. syringae*. These results confirmed the phylogenetic assignments obtained by multiplex PCR.

Among the 1708 isolates from apricot and kiwifruit plants, the results obtained with the *P. syringae* specific primers showed that about 11 % (188) of those considered as putative *P. syringae* at the time of isolation were in fact not members of this species. For those that were *P. syringae* according to the specific primers, phylogenetic affiliation could not be

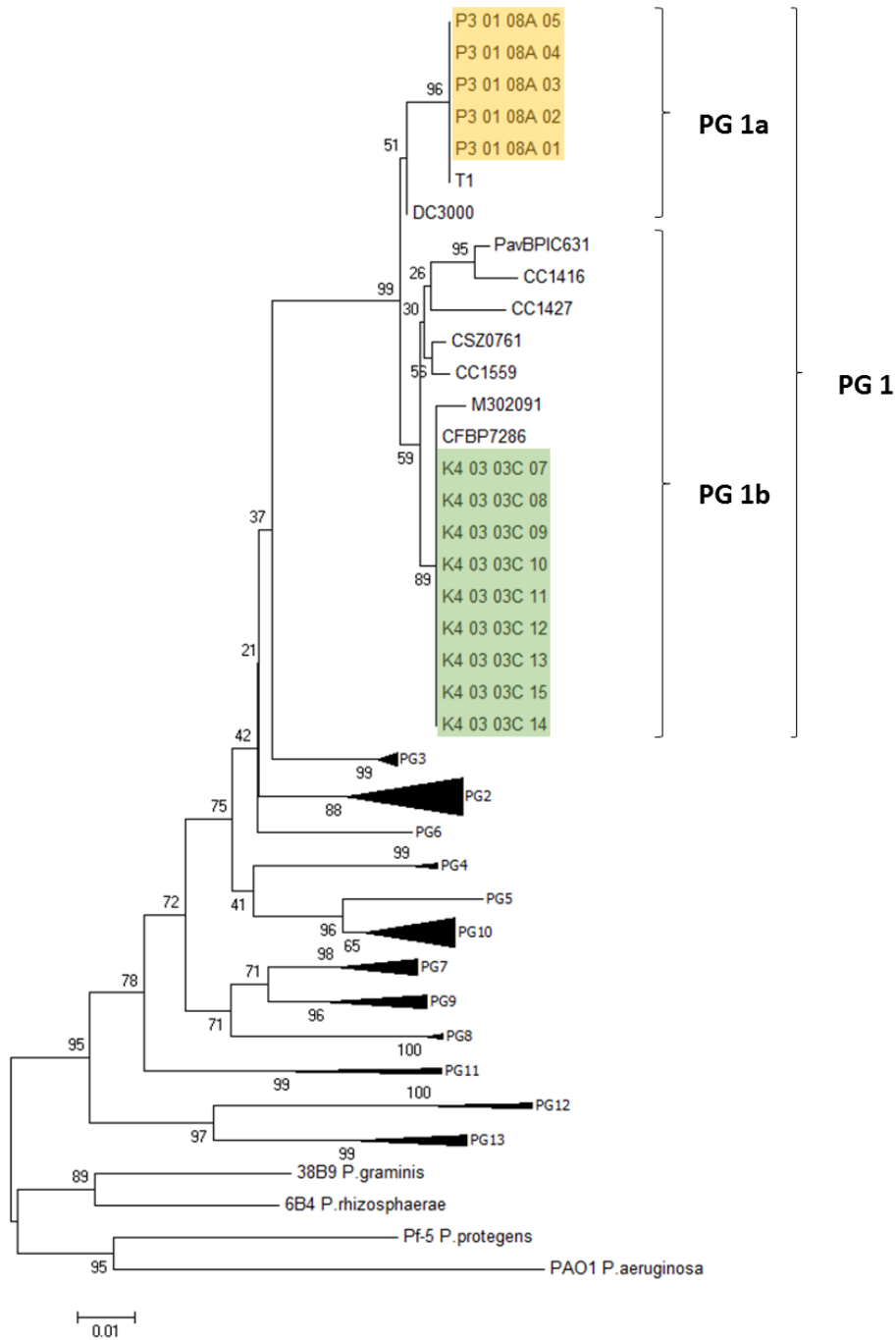
**Figure 2B**



**Figure 2.** Phylogenetic trees, constructed with MEGA6 software by using *cts* gene sequences, neighbor joining method and 3000 bootstrap replicates, showing the genetic diversity among 54 phylogroup 1 (A) and 18 phylogroup 2 (B) strains. Strains from apricot and kiwifruit orchards are highlighted in orange and green, respectively. The first two digits indicate the orchard identification, the second two digits the sampling date (01 for T1, 02 for T2 and 03 for T3), the next three digits the sampling location within the orchards (from 1 to 5 in kiwifruit orchards and from 1 to 9 in apricot orchards) and the type of substrate (A and B for buds, C for twigs and E for ground covers), and the last two digits are the strain number. Ground cover strains were highlighted by a green star (★).

determined with the phylogroup-specific primers for 17 % (299) of the isolates. On orchard ground covers, phylogenetic affiliation could not be determined for about 25 % of the isolates, and about 20 % of the original isolates were found to not belong to *P. syringae* (Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2).

Phylogroups 1 and 2 were the dominant parts of the *P. syringae* populations on apricot and kiwifruit plants. Phylogroup 1 represented about 64 and 33 %, and phylogroup 2 about 10 and 21 %, of the *P. syringae* populations on apricot and kiwifruit plants, respectively. Genetic diversity of 72 strains in phylogroups 1 and 2 (48 from trees and 24 from ground cover for comparison) for which the *cts* gene was sequenced, is shown in Figure 2. Furthermore, phylogroups 7 and 8 represented about 2 and 4 % of the *P. syringae* populations on apricot and kiwifruit plants, respectively. Phylogroup 13 was only isolated on kiwifruit plants, and represented about 3% of the *P. syringae* populations. Finally, at first sampling 7 isolates belonging to phylogroup 10 and one isolate belonging to phylogroup 3 were isolated from P3 apricot buds and K4 kiwifruit buds, respectively, representing less than 1 % of the *P. syringae* populations. For comparison, apricot orchard ground cover *P. syringae* populations were dominated by phylogroups 1 and 2, representing 24 and 41 % of the *P. syringae* populations, respectively. The kiwifruit orchard ground cover *P. syringae* populations were dominated by phylogroups 2, 7 and 8, representing 11 and 25 % of the *P. syringae* populations, respectively. Among the 4167 isolates from trees and ground covers, those belonging to phylogroup 1 were tested with PCR primers for identification as Psa-like (Rees-George *et al.*, 2010). Of the 828 phylogroup 1 isolates from apricot and kiwifruit buds, leaves and twigs that could be sub-cultured for PCR, about 30% (217 isolates) were identified as Psa-like according to this test: 166 from K4 buds and twigs, 2 from K2 buds, and 1 from K3 buds. Interestingly, 32 were from P3 apricot buds (Table S1). The identity of a few randomly selected Psa-like strains was further



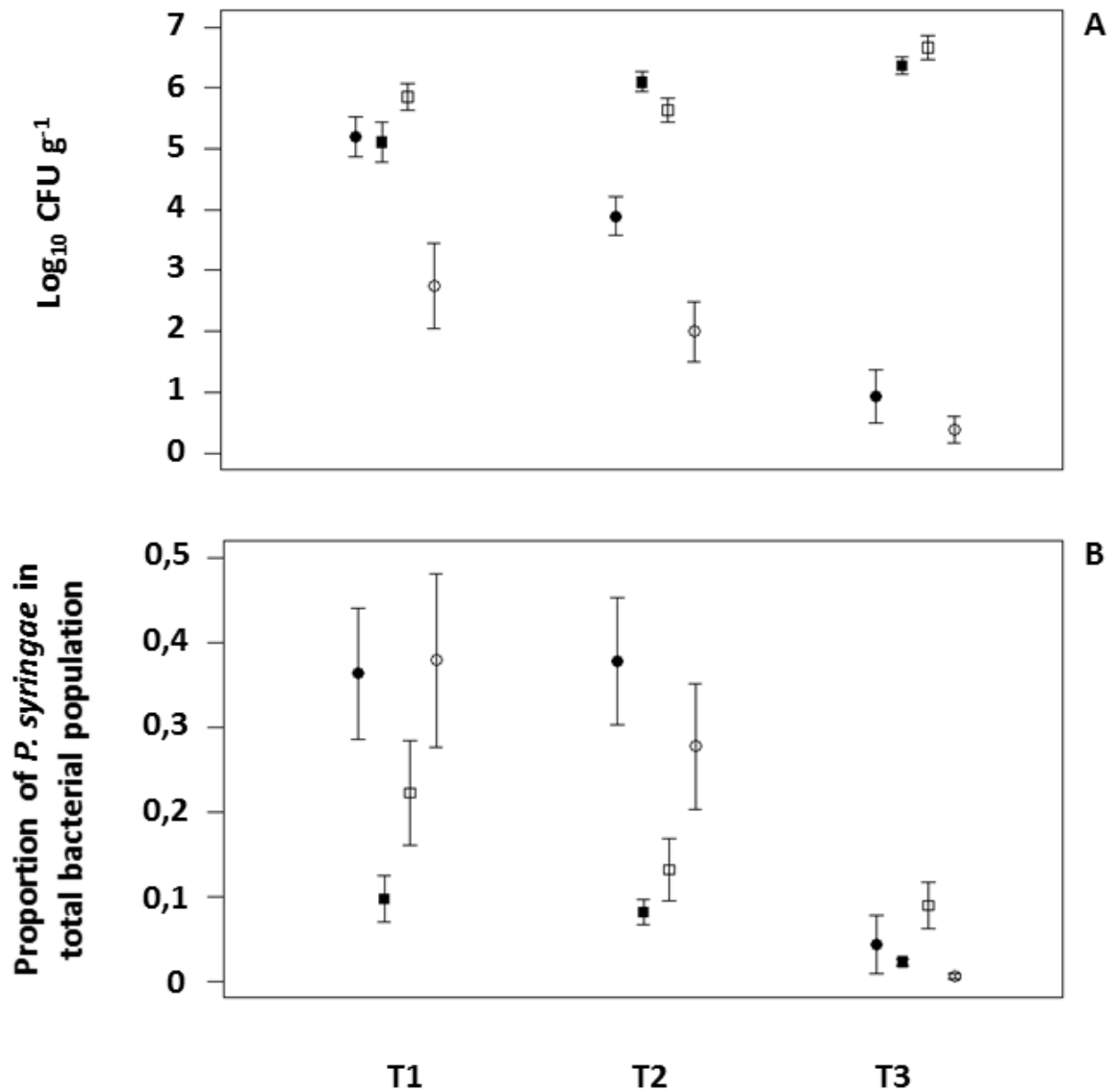
**Figure 3.** Phylogenetic tree, constructed with MEGA6 software by using *cts* gene sequences, neighbor joining method and 3000 bootstrap replicates, showing the affiliation to the phylogroups 1a and 1b of a sub-sample of *P. syringae* strains identified as Psa-like by specific PCR from apricot buds and kiwifruit twigs, respectively. Strains from apricot buds and kiwifruit twigs are highlighted in orange and green, respectively. Current epidemic Psa bv. 3 strain (CFBP7286) belongs to phylogroup 1b. The figure shows that apricot bud strains are neither related to the current epidemic Psa strain, nor to the same phylogenetic clade (1a vs. 1b), whereas kiwifruit twig strains are related to the current epidemic Psa strain (clonal on the basis of the *cts* sequence).

determined by sequencing the *cts* housekeeping gene. The sequences of the 5 and 9 randomly chosen strains from apricot buds and kiwifruit twigs, respectively, showed that those from kiwifruit twigs were related to the current epidemic strain of *Psa* bv. 3 belonging to phylogroup 1b, while the isolates from apricot buds were related to *P. syringae* strains from phylogroup 1a and not to the current epidemic strain (Figure 3). In light of these results, all *Psa*-like isolates are currently being characterized more fully.

***P. syringae* abundance on apricot and kiwifruit trees decreases over the growing season, but *P. syringae* constitutes higher fractions of the total bacterial community on trees than on ground cover plants.**

On both apricot and kiwifruit plants, *P. syringae* absolute and relative abundances had the same decreasing trend (Figure 4). *P. syringae* absolute abundance on apricot and kiwifruit plants was similar when comparing first and second sampling times (p-value = 0.356 and 0.143, respectively), and lower at the third sampling time compared to first and second sampling (p-value = 0.003 and 0.009 for apricot trees, p-value =  $2 \times 10^{-6}$  and 0.001 for kiwifruit vines). Same results were observed for relative abundance: there was no significant difference between the two first samplings (p-value = 0.337 and 0.895, respectively), but there were higher relative abundances at the first and second samplings than at the third one (p-value = 0.031 and 0.014 for apricot trees, p-value = 0.004 and 0.004 for kiwifruit vines, respectively). Overall, absolute abundance at T1 and T2 was higher on kiwifruit than on apricot plants (p-value = 0.007 and 0.006, respectively). However, at T3, no significant difference was observed between *P. syringae* absolute abundance on apricot and kiwifruit plants (p-value =

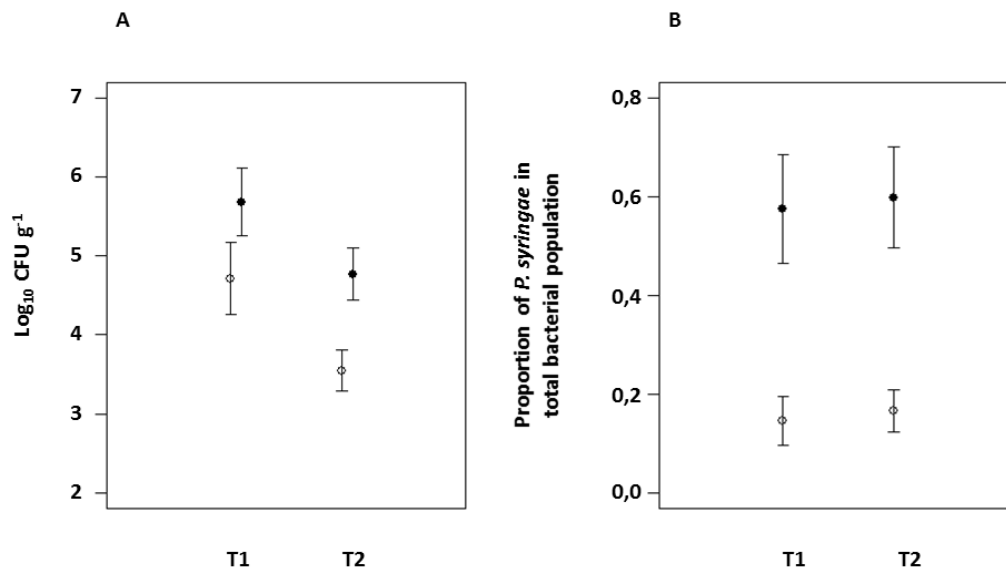




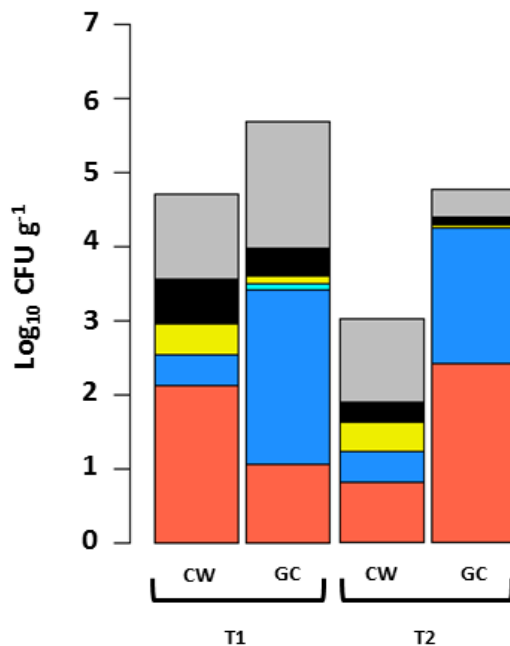
**Figure 4.** *P. syringae* absolute (A) and relative (B) abundances (means and standard errors) on kiwifruit (●) and apricot (○) plants and their corresponding ground covers (■ = kiwifruit, □ = apricot) in Drôme county (southeastern France). T1 = 11 March (apricot) and 1 April (kiwifruit) 2014, T2 = 30 April (kiwifruit) and 2 June (apricot) 2014, T3 = 20 October (apricot) and 24 November (kiwifruit) 2014.

0.274) (Figure 4A). By comparing the *P. syringae* absolute abundances from kiwifruit buds and ground covers, no significant difference was observed at T1 (p-value = 0.85), whereas at T2 and T3 absolute abundances were significantly higher on ground covers than on buds and twigs (p-value =  $2 \times 10^{-6}$  and  $4 \times 10^{-6}$ , respectively). However, individual analyzes showed that at T1 in orchard K2 *P. syringae* absolute abundance was lower on buds than on ground cover per gram of plant tissue (p-value = 0.003) but in orchard K4 the opposite trend was observed: *P. syringae* absolute abundance was higher on buds than on ground cover (p-value = 0.0002). And at T2 in orchard K4, buds and ground cover had similar *P. syringae* absolute abundances (p-value = 0.224). At T1 in apricot orchard P2 *P. syringae* could only be isolated on buds from one tree, and at T2 and T3 no *P. syringae* were recovered - neither from leaves nor from twigs. At T1 in orchard P2, the *P. syringae* absolute abundance was higher on ground cover than on the buds from this one apricot tree. In orchard P3, where *P. syringae* could be isolated from the apricot trees at all three sampling times, no significant difference was observed between *P. syringae* absolute abundances on buds and ground cover at T1, but at T2 and T3 *P. syringae* absolute abundances were significantly higher on ground cover than on leaves and twigs (p-value = 0.861,  $2 \times 10^{-5}$  and  $6 \times 10^{-9}$ , respectively).

Concerning *P. syringae* relative abundances, at T1 and T2 they were significantly higher on kiwifruit buds than on ground covers (p-value = 0.002 and 0.0003, respectively). Similar result was observed in apricot orchard P3 with significantly higher relative abundances on buds and leaves than on ground cover (p-value = 0.018 and  $2 \times 10^{-6}$ , respectively). At T3 in orchard K4 relative abundance was still higher on kiwifruit twigs than on ground cover (p-value = 0.028), whereas at T3 in orchard P3 no significant difference was observed between relative abundances of apricot buds and ground cover (p-value = 0.107) (Figure 4B).



**Figure 5.** *P. syringae* absolute (A) and relative (B) abundances (means and standard errors) on kiwifruit buds from orchards located in Drôme county (southeastern France), with either chemically weeded rows (○, K1 and K2) or ground cover on the rows (●, K3 and K4).



**Figure 6.** Size and structure of *P. syringae* populations on kiwifruit buds from orchards located in Drôme county (southeastern France), with either chemically weeded rows (CW, mean of K1 and K2) or ground cover on the rows (GC, mean of K3 and K4) at T1 and T2. The heights of the bars represent the log<sub>10</sub> CFU g<sup>-1</sup> of fresh matter for the entire *P. syringae* population. Population structure is indicated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population. ■ = Phylogroup 1, ■ = Phylogroup 2, ■ = Phylogroup 3, ■ = Phylogroups 7 and 8, ■ = Phylogroup 13 and ■ = Without phylogenetic affiliation. T1 = 1 April 2014, T2 = 30 April 2014.

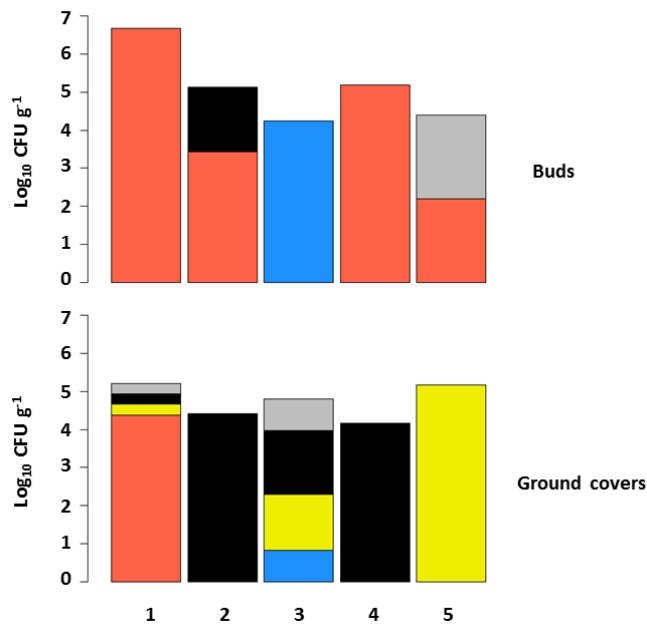
### ***P. syringae* abundances and population structure associated with kiwifruit buds are correlated to row ground cover management**

The buds of kiwifruit in orchards with ground cover on their plant rows (K3 and K4) had higher absolute abundances of *P. syringae* than those of kiwifruit in orchards with chemically weeded plant rows (K1 and K2) (Figure 5A). These differences were significantly different for a p-value of 10 % at T1 (p-value = 0.076) and 5% at T2 (p-value = 0.024). Moreover, the *P. syringae* relative abundances were also significantly higher on kiwifruit buds at T1 and T2 (p-value = 0.001 and 0.001, respectively) in the orchards with ground cover on the plant rows compared to those with chemically weeded rows (Figure 5B). Furthermore, permanova analyses indicate that *P. syringae* population structure was correlated to row ground cover management (p-value = 0.001). The presence of ground cover on the plant row was correlated to an increase of phylogroup 2, however orchards K3 and K4 presented highly dissimilar population structures and other specific trends could not be identified (Figure 6). At T3, *P. syringae* was only detected in twigs in one kiwifruit orchard: in K4 where there was no chemical weeding and ground cover was present both in and between rows.

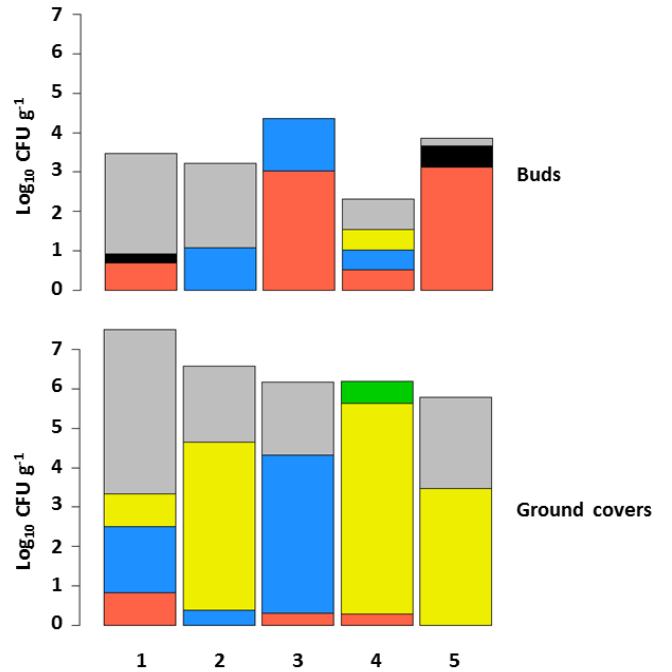
For apricot orchards, it was difficult to identify a trend due to ground cover because of the high variability of *P. syringae* abundance among orchards. Firstly, abundances in P2 and P3, both chemically weeded in the rows, were markedly different. At T1 *P. syringae* was detected on buds on all 9 trees in P3 at an average density of  $1.48 \times 10^7$  CFU g<sup>-1</sup> whereas in P2 *P. syringae* was only detected on buds on 1 of 9 trees at an abundance of  $5.97 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup>. At T2, *P. syringae* was detected again on leaves of all 9 trees in P3 ( $1.69 \times 10^4$  CFU g<sup>-1</sup> on average) whereas it was not detected on leaves of any of the trees in P2. At T3, twigs of 3 trees in P3 harbored *P. syringae* ( $2.76 \times 10^2$  CFU g<sup>-1</sup> on average for the 3 trees) but the bacterium was not

## Figures 7A to 7L

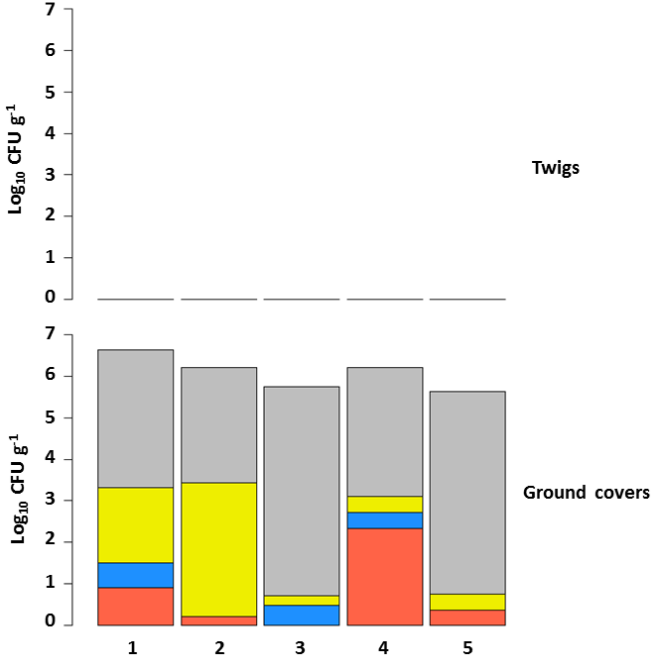
**A** Kiwifruit orchard K1 - Sampling time T1



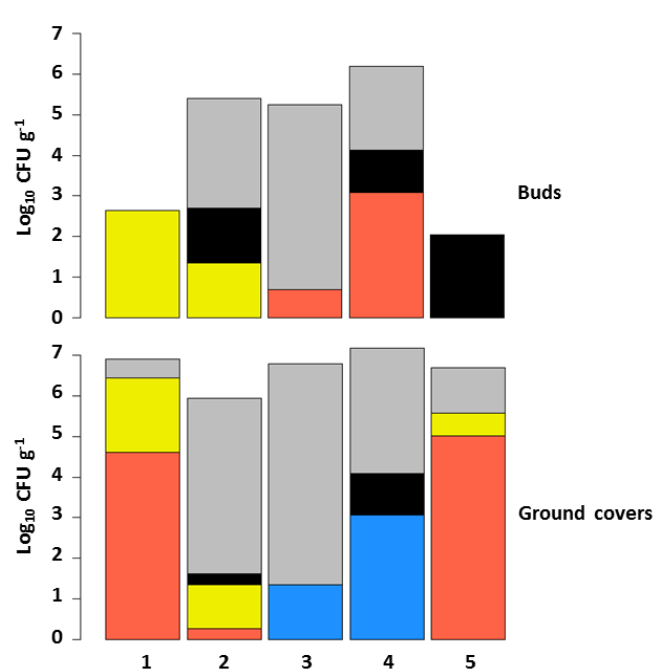
**B** Kiwifruit orchard K1 - Sampling time T2



**C** Kiwifruit orchard K1 - Sampling time T3



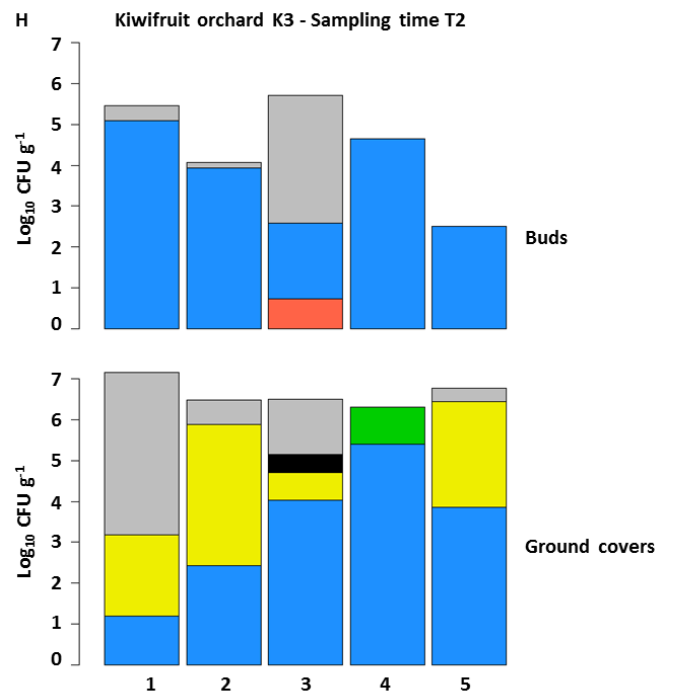
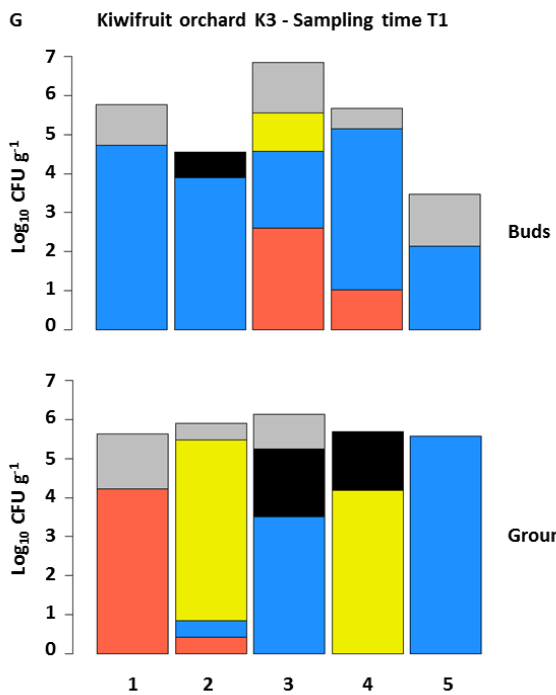
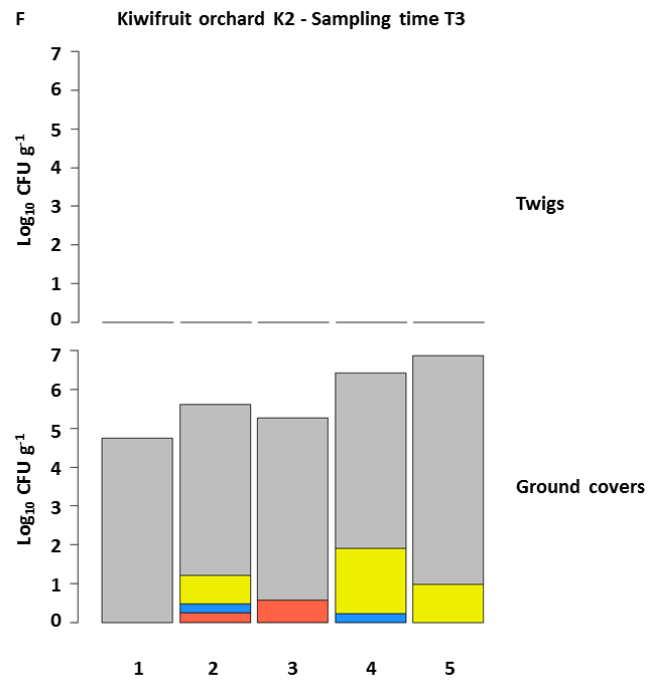
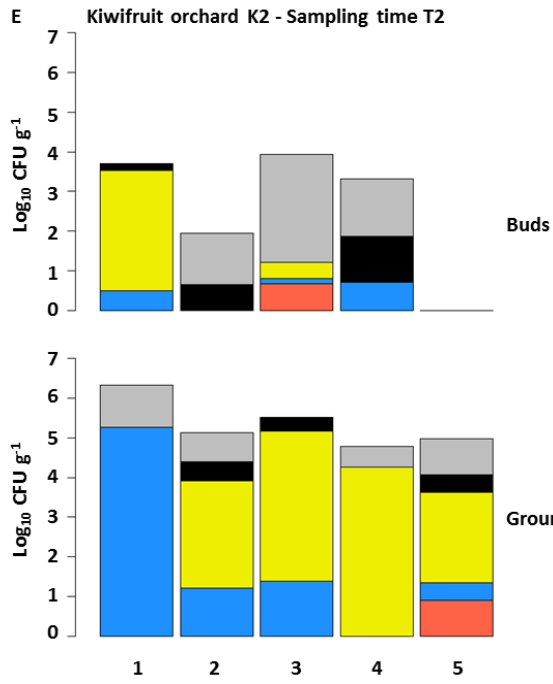
**D** Kiwifruit orchard K2 - Sampling time T1



detected in any of the 9 trees in P2. Interestingly, P3 was situated near K4 (17 km apart) but about 110 km from P2 and there were marked climate and soil type differences between these regions thereby raising questions about the importance of local conditions in the similarity of P3 and K4 and the dissimilarity of P3 and P2. We had the unique opportunity to compare P2 and P3 with the unusual situation of an apricot orchard where ground cover was completely absent from both the rows and between rows (P1). In P1, the detection of *P. syringae* was rare (on one tree at T1, on no trees at T2 and on two trees at T3 with abundances between about  $10^2$  and  $10^3$  CFU g<sup>-1</sup> when the bacterium was present). However, P1 was near to P2 (< 1 km) and therefore the effect is likely due to location. The low rates of occurrence of *P. syringae* in P1 and P2 precluded pertinent statistical tests of any differences.

### ***P. syringae* population structures analyses highlighted similarities between trees and ground covers**

We looked for correlations in the structures of *P. syringae* populations on trees and the presence or abundance of the different phylogroups of *P. syringae* on the ground cover next to each tree. These correlations were sought in the context of a high amount of spatial and temporal variability in structures of *P. syringae* populations in trees and on ground cover. Overall, in kiwifruit orchards *P. syringae* population structures from buds were significantly different between orchards at the first (p-value = 0.005) and second samplings (p-value = 0.001) (Figures 7A-7H). At the third sampling *P. syringae* was isolated only from twigs in orchard K4 (Figure 7I). Within orchards K1, K2, K3, K4 and P3 (Figures 8A-8C), *P. syringae* population structures from kiwifruit and apricot plants were significantly different among sampling dates (p-value = 0.002, 0.004, 0.006, 0.002 and 0.001, for orchards K1, K2, K3, K4 and



P3, respectively). Furthermore, *P. syringae* population structures were significantly different between kiwifruit vines and their corresponding ground covers at all three sampling dates (p-value = 0.013, 0.001 and 0.001, respectively for T1, T2 and T3. At T3 only K4 was tested), either with permutation constraints within orchards or no permutation constraints. Similar results were obtained for apricot orchard P3 (p-value = 0.024, 0.001 and 0.002, for T1, T2 and T3, respectively).

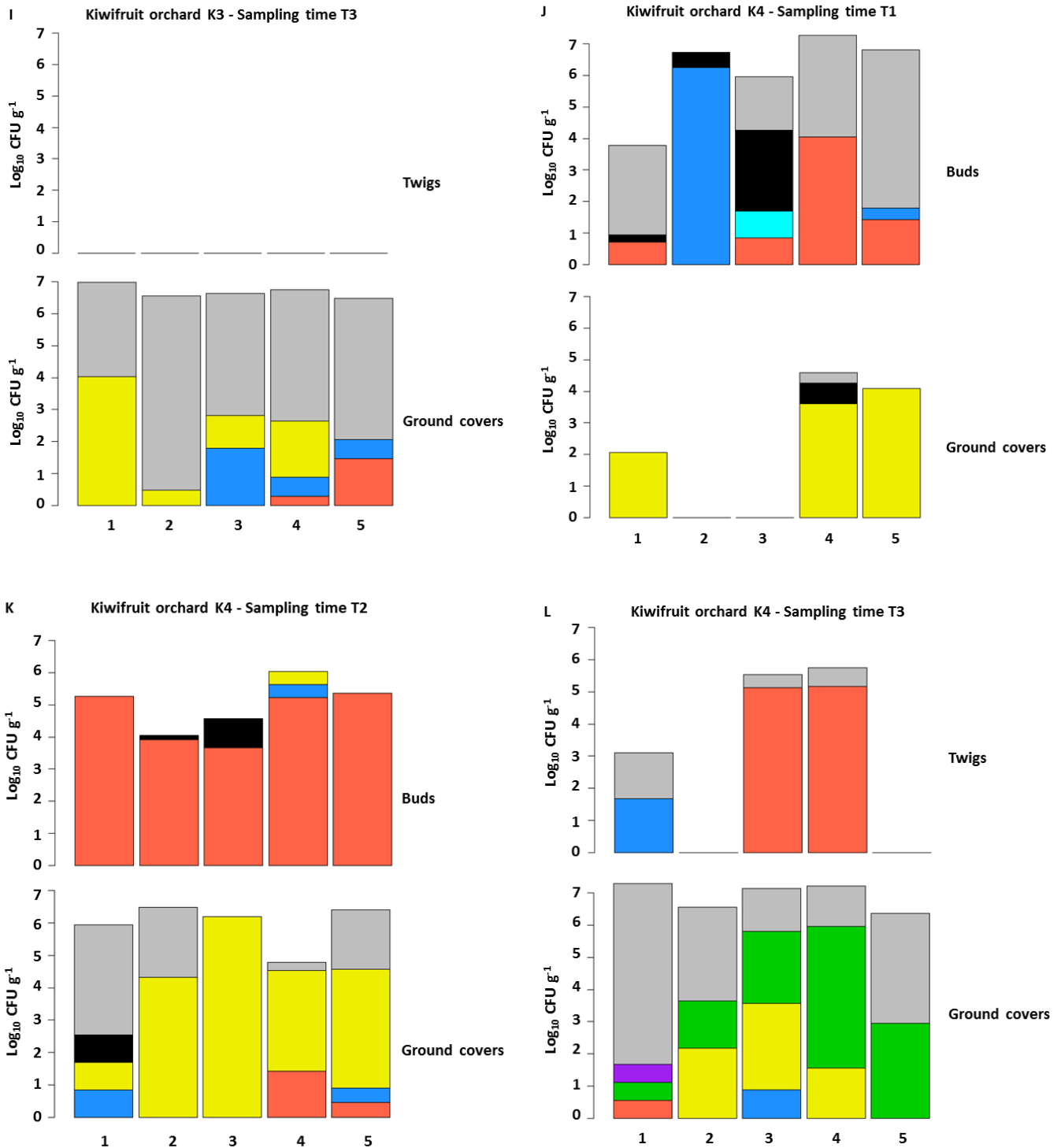
Co-occurrences of *P. syringae* belonging to the same phylogroups simultaneously on kiwifruit or apricot plants and their corresponding ground covers were observed in all orchards. The co-occurrences were frequent in orchards K1, K2 and K3, with 60, 63 and 67 % of co-occurrences, respectively, but less frequent in orchards K4 and P3 with 24 and 44 % of co-occurrences, respectively.

The structure of *P. syringae* populations also revealed that phylogroups 1 and 2 rarely co-exist on apricot or kiwifruit plants. This was revealed in PCA where axes describing variability due to PG1 and to PG2 were frequently in opposite directions (Figs. 9-12). Pairwise comparisons of abundances of PG1 and PG2 more specifically revealed a negative correlation over all data for trees and ground covers (Fig. 13).

#### **When present on kiwifruit plants, Psa-like isolates always co-occur with other genetic lines of *P. syringae***

In kiwifruit orchard K4, Psa-like isolates were recovered from buds at T1, simultaneously from buds and ground covers at T2 (Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2), and from twigs at T3. At first sampling, about 20 % of the total *P. syringae* population of the kiwifruit buds was Psa-like, which represents about  $1.27 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> of fresh matter. At second sampling,





**Figure 7.** Size and structure of *P. syringae* populations from five kiwifruit plant-ground cover pairs from orchards K1 (A-C), K2 (D-F), K3 (G-I) and K4 (J-L), located in Drôme county (southeastern France). The heights of the bars represent the  $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$  of fresh matter for the entire *P. syringae* population. Population structure is indicated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population. ■ = Phylogroup 1, ■ = Phylogroup 2, ■ = Phylogroup 3, ■ = Phylogroups 7 and 8, ■ = Phylogroup 9, ■ = Phylogroup 10, ■ = Phylogroup 13 and ■ = Without phylogenetic affiliation. T1 = 1 April 2014, T2 = 30 April 2014, T3 = 24 November 2014.

about 87 % of the total *P. syringae* population of the kiwifruit buds was Psa-like, which represents about  $2.68 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup> of fresh matter. At the third sampling, about 73 % of the total *P. syringae* population from kiwifruit twigs was Psa-like, which represents about  $1.29 \times 10^5$  CFU g<sup>-1</sup> of fresh matter.

In kiwifruit orchard K1 no Psa-like isolates were recovered from buds, nor from twigs, and no Psa-like isolates were recovered from ground covers (Borschinger *et al.*, in prep, refer to chapter 2). However, Psa-like isolates were recovered from K2 and K3 buds at T1. Furthermore, Psa-like isolates were recovered from K3 ground covers at T1 and T3 (Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2). These Psa-like isolates represent about 2 % of the total *P. syringae* population from the kiwifruit buds, which represents about  $10^4$  CFU g<sup>-1</sup> of fresh matter.

## Discussion

To our knowledge this is the first quantitative assessment of the genetic structure of *P. syringae* populations under natural conditions in orchards. We have assessed this population structure for kiwifruit and apricot trees and for the associated ground covers. For kiwifruit orchards, we have shown that *P. syringae* population structures and abundances on buds are correlated to ground cover management practices with, in particular, absolute and relative abundances of *P. syringae* in bacterial populations on buds in orchards with ground cover in plant rows being higher than in orchards with chemically weeded plant rows. The mechanism underlying this difference is not clear. Possible explanations might be that the in-row ground cover provides enough additional bacterial inoculum to influence populations on trees and/or that mowing or other activities in rows generate aerosol particles containing *P. syringae* that

Figures 8A - 8I

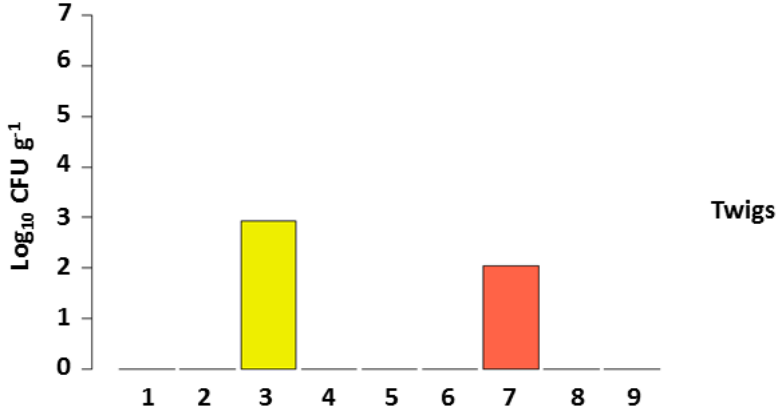
A Apricot orchard P1 - Sampling time T1



B Apricot orchard P1 - Sampling time T2



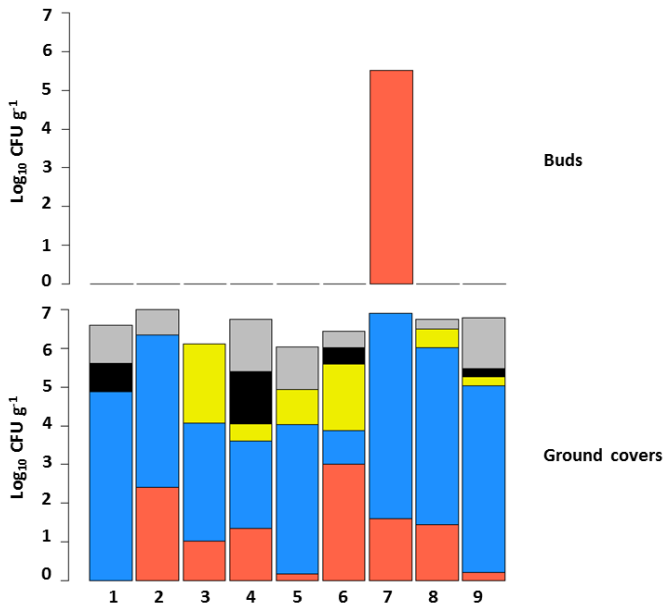
C Apricot orchard P1 - Sampling time T3



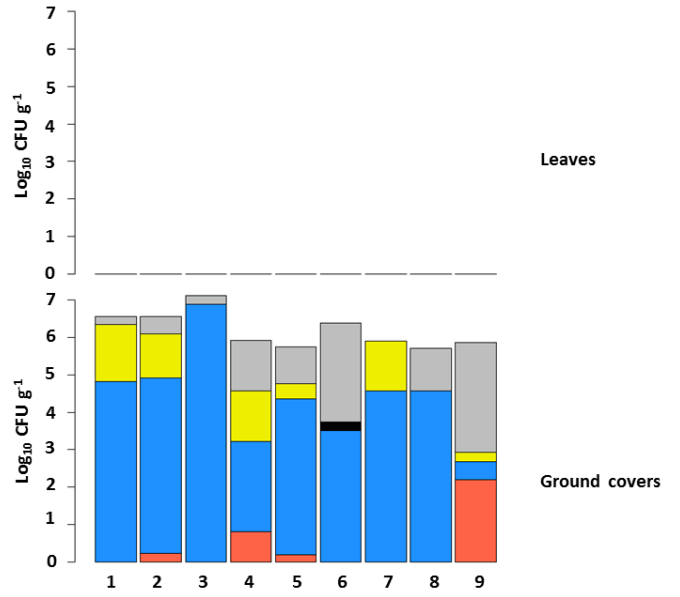
settle onto the exposed parts of fruit trees, *i.e.* buds, leaves or dermosphere from stem and twigs. This phenomenon could permit the installation of *P. syringae* on these tissues, or contribute additional cells to already-present *P. syringae* populations, explaining thus the higher abundances compared to orchards with chemically weeded plant rows.

One difficulty in elucidating the link between *P. syringae* populations on ground covers and on trees is the high diversity of *P. syringae* populations on tree tissues and the important variability in this diversity among trees in a same orchard and among orchards. Likewise, the structure of the *P. syringae* populations varied among ground cover samples in a same site and among sites. *P. syringae* populations from apricot and kiwifruit buds, leaves and twigs and from ground covers were composed of an assembly of different genetic lineages belonging to phylogroups 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 13 and other unidentified phylogroups with up to four of these groups found together in samples from the same trees or in the same bulk samples of ground cover. This variability gave the impression of random associations among phylogroups. Nevertheless, we revealed a negative correlation between the abundances of *P. syringae* from phylogroups 1 and 2 in populations on tree tissues and on ground covers. In other words, when phylogroup 1 was dominant in a sample, phylogroup 2 was rare and vice versa. Interestingly, these two phylogroups were the only ones that frequently achieved dominance in populations on tree tissue and on ground covers. Phylogroup 7 was frequently dominant on ground covers but not on bud, leaf or twig tissues from trees. From this observation, it is tempting to suggest that methods to favor the abundance of phylogroup 2 in kiwifruit plants might be a means to attenuate the risk of disease caused by Psa to kiwifruit. Phylogroup 2 was more abundant on ground covers in orchards without chemical weeding in the rows based on a global analysis of all orchards. But the lack of correlation between *P. syringae* population structures on ground covers, and that on tree tissues and bacterial canker severity within

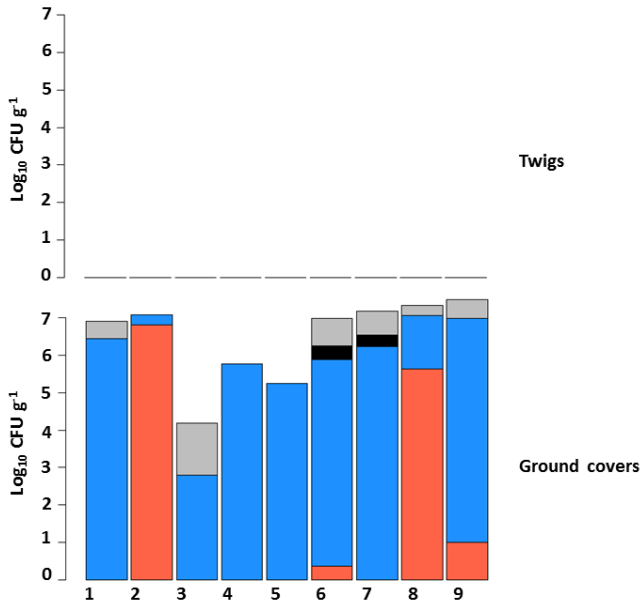
D Apricot orchard P2 - Sampling time T1



E Apricot orchard P2 - Sampling time T2



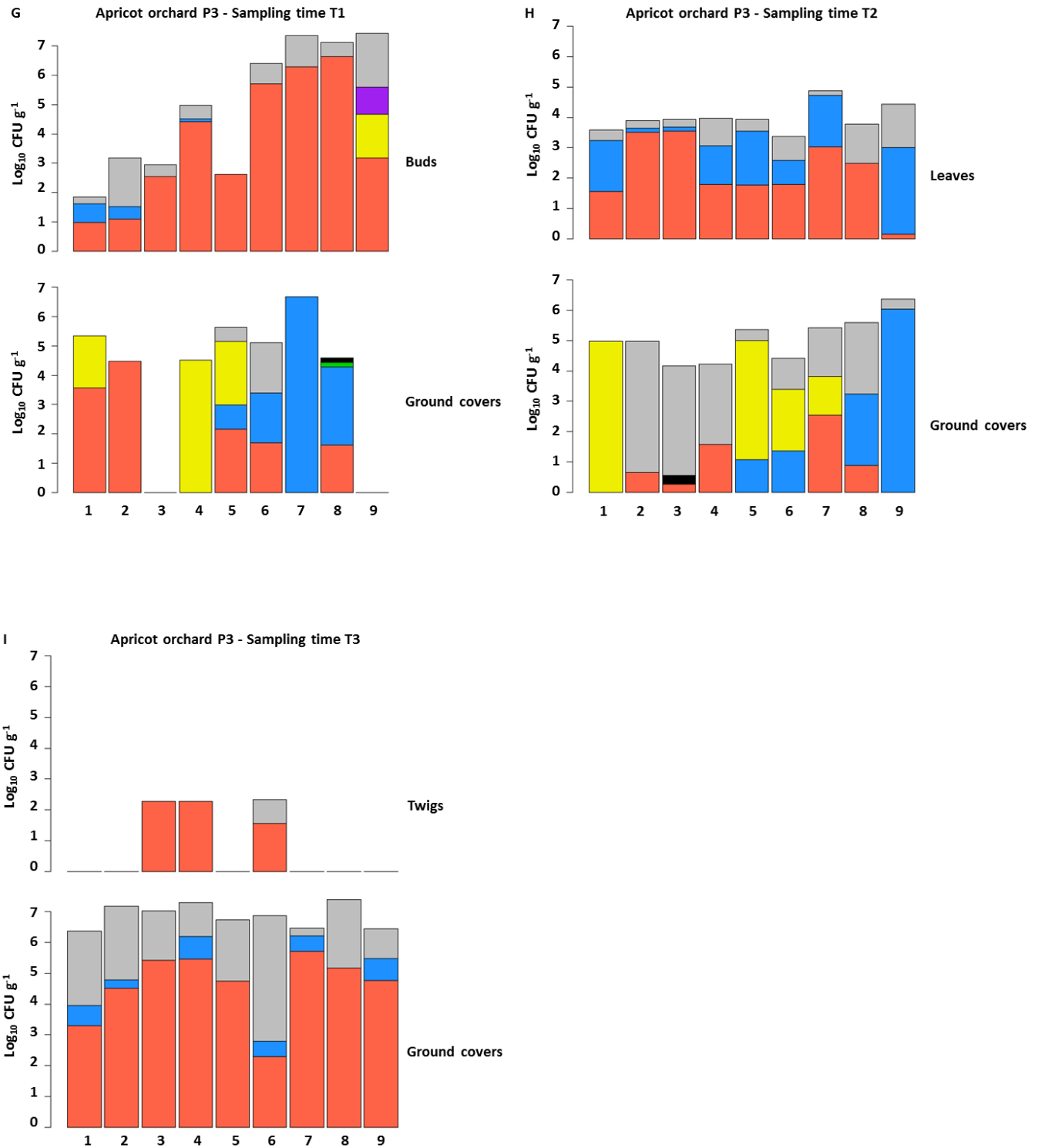
F Apricot orchard P2 - Sampling time T3



individual kiwifruit orchards prohibit us from suggesting how ground cover could be used to influence phylogroup 2 populations and plant health. In apricot orchards, some of the phylogroup 1 isolates obtained from buds in P2 and P3 and from corresponding ground covers in these orchards had identical partial *cts* sequences. This supports the presence of vertical exchanges between the trees and their ground covers. Nevertheless, direction of these exchanges, *i.e.* upward, downward or in both directions, is unclear.

In our previous work (Borschinger et al, in prep., refer to chapter 2) we demonstrated that the diversity of *P. syringae* on ground covers in kiwifruit orchards was different from that in apricot orchards. In kiwifruit orchards phylogroups 1 and 2 were less abundant and phylogroups 7, 8, 9, 13 and those without a phylogroup attribution according to our PCR scheme were more abundant than in apricot orchards. This difference in ground cover populations seemed to be reflected in the population structures on bud, leaf and twig tissues of trees. Phylogroup 1 alone or phylogroups 1 and 2 were in every apricot tissue sample when *P. syringae* was detected, there was only 1 case where phylogroups 7 and 8 were detected and phylogroup 13 was never detected on apricot tissues. On kiwifruit tissues, phylogroups 7, 8 and 13 were frequently detected and there were numerous examples where phylogroups 1 and 2 were not detected. These results might suggest that the *P. syringae* populations on ground covers in fact reflect those on the trees. However, we detected Psa-like bacteria on the ground cover in kiwifruit orchard K3, an apparently healthy orchard in which Psa-like bacteria were detected only once on buds from one kiwifruit plant at T1.

The capacity for kiwifruit to harbor very diverse populations of *P. syringae* is further illustrated by diseased orchards such as K4 where the *P. syringae* communities from the kiwifruit plants were not composed by only one pathogenic clonal strain. Although buds and twigs from K4 were colonized by Psa-like isolates, constituting up to 87 % of the total *P. syringae* population,



**Figure 8.** Size and structure of *P. syringae* populations from nine apricot tree-ground cover pairs from orchards P1 (A-C), P2 (D-F) and P3 (G-I), located in Drôme county (southeastern France). The heights of the bars represent the  $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$  of fresh matter for the entire *P. syringae* population. Population structure is indicated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population. ■ = Phylogroup 1, ■ = Phylogroup 2, ■ = Phylogroups 7 and 8, ■ = Phylogroup 9, ■ = Phylogroup 10, ■ = Phylogroup 13 and ■ = Without phylogenetic affiliation. T1 = 11 March 2014, T2 = 2 June 2014, T3 = 20 October 2014.

other genetic lines of *P. syringae* were present. These results confirm the interest of the co-inoculation experiments and the observations of co-existence of Psa and environmental *P. syringae* strains within kiwifruit plants made by Bartoli and colleagues (Bartoli *et al.*, 2015). This result begs the question of the role of strains co-existing with Psa in disease outcome. It also highlights the importance of quantitative isolations in disease diagnosis.

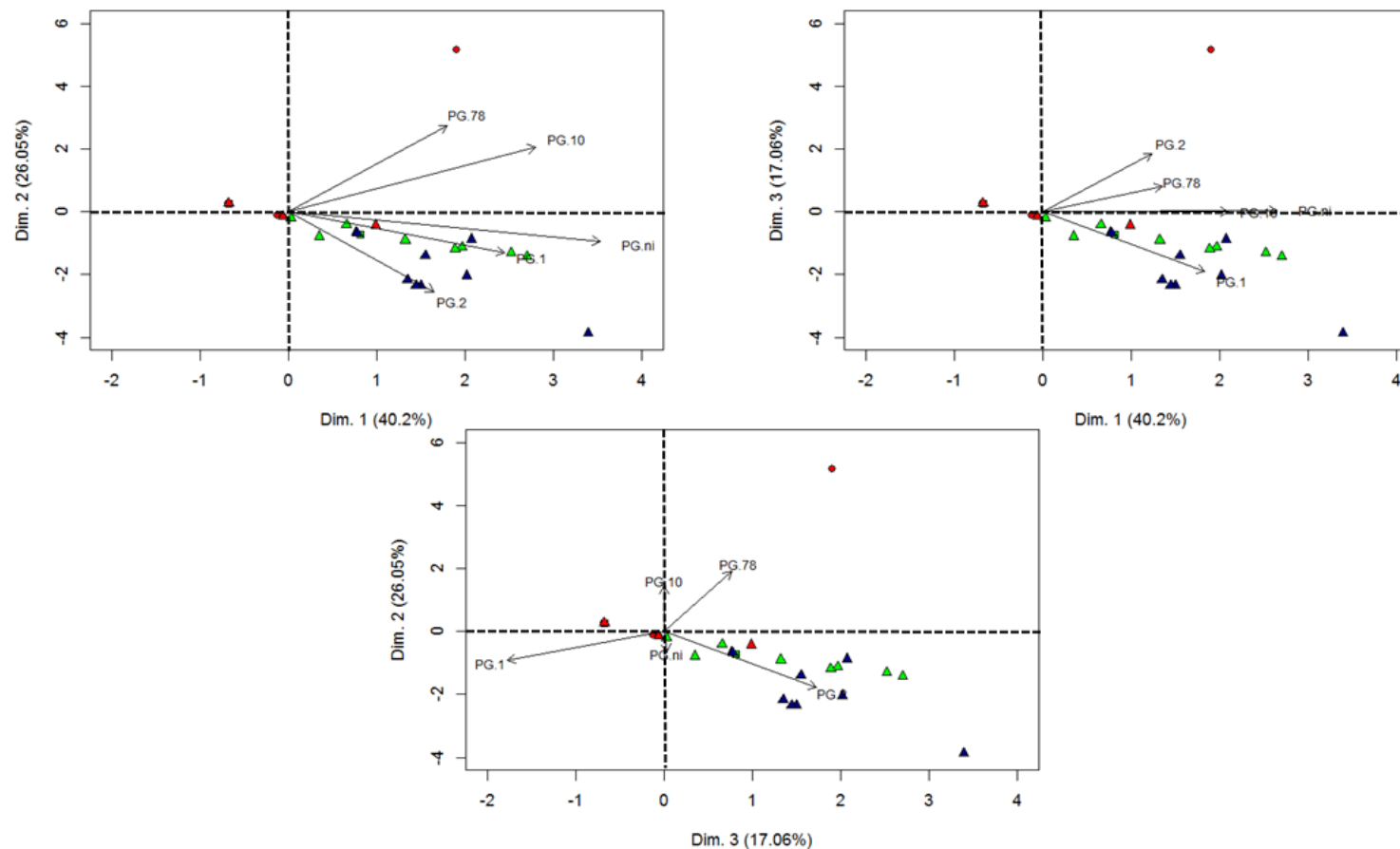
In light of our results, it appears clearly that even in absence of related population structures some exchanges happen between the apricot and kiwifruit plants and their ground covers. The presence of co-existing phylogroups and genetically related *P. syringae* on buds and ground covers attest these exchanges. It is yet not clear in which direction these exchanges happened. Ground cover management practices, at least plant row ground cover management, is correlated to *P. syringae* abundances on kiwifruit plants. Tree rows with plant ground cover enhance *P. syringae* abundance on the trees but it is yet not clear if high abundances on trees are correlated or not to disease outbreak. Orchards such as K3 with high *P. syringae* abundances on the plants did not present any symptoms and presented good yields (data not shown). Further investigation is needed to clarify the best ground cover management practices taking into account orchard geographic locations and disease pressure.

## References

- Anderson, M.J. (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* **26**: 32-46.
- Baca, S., and Moore, L.W. (1987) *Pseudomonas syringae* colonization of grass species and cross infectivity to woody nursery plants. *Plant Dis* **71**: 724-726.
- Balestra, G.M., Mazzaglia, A., Quattrucci, A., Renzi, M., and Rossetti, A. (2009) Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australas Plant Dis Notes* **4**: 34-36.
- Bartoli, C., Lamichhane, J.R., Berge, O., Guilbaud, C., Varvaro, L., Balestra, G.M. *et al.* (2015) A framework to gauge the epidemic potential of plant pathogens in environmental reservoirs: the example of kiwifruit canker. *Mol Plant Pathol* **16**: 137-149.
- Berge, O., Monteil, C.L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D.C., and Morris, C.E. (2014) A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS one* **9**: e105547.



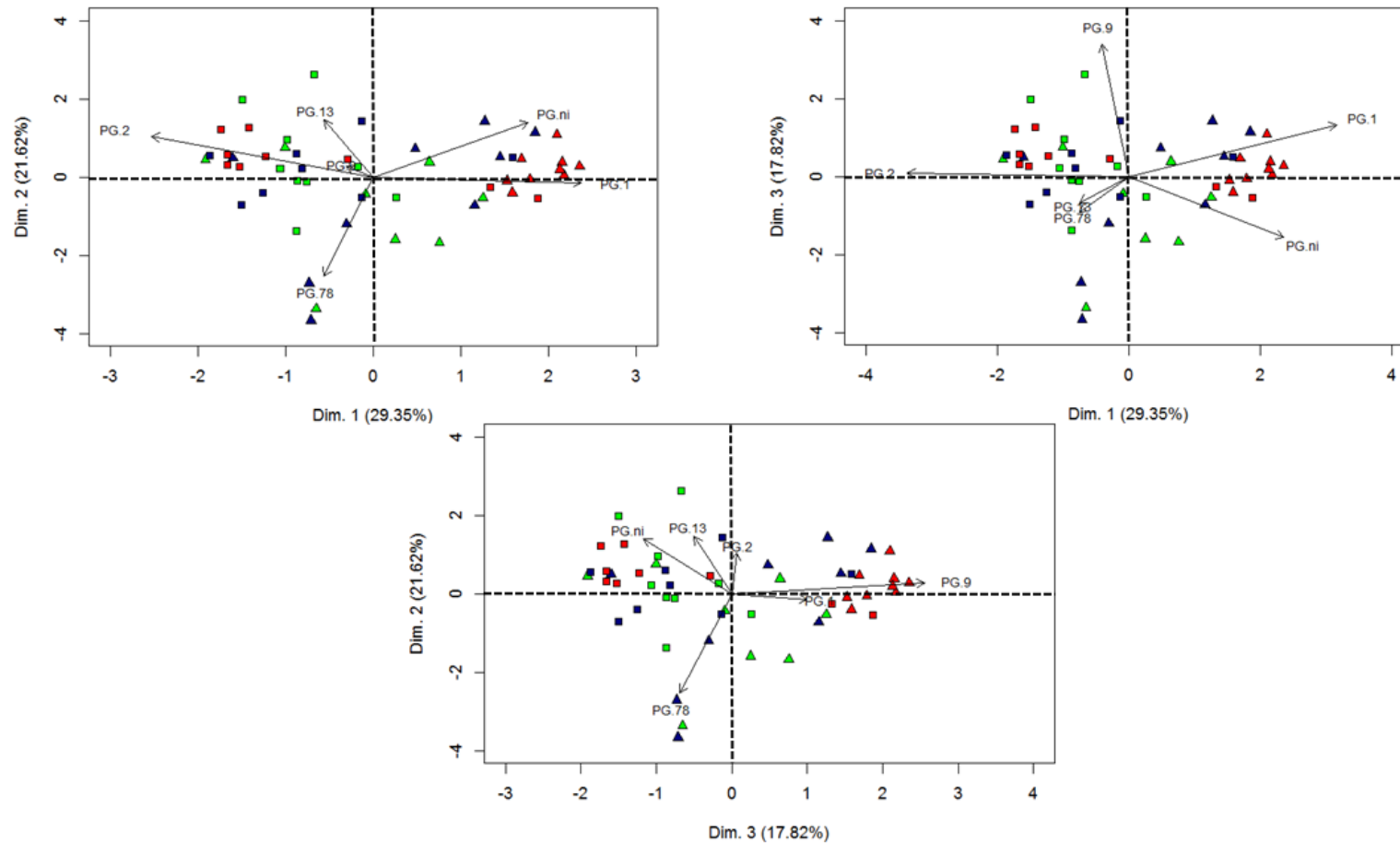
### PCA - Apricot trees



**Figure 9.** Schematic representation of coordinates of initial variables (Phylogroup abundances expressed as  $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$  of fresh matter. Abundances are calculated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population) and of associated observations (bud, leaf and twig samples at T1 ■, T2 ■ and T3 ■ respectively, from apricot orchards P1 , P2  and P3 ) on the axes calculated by a principal component analysis (PCA). The graph axes are constituted by the first three PCA components (Dim. 1, 2 and 3) which illustrate 40.2 %, 26.05 %, and 17.06 % of the data set variability, respectively

- Borschinger, B., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Parisi, L., Bourgeay, J.F. *et al.* (2016) A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas syringae* phylogroups. *J Appl Microbiol* **120**: 714-723.
- Borschinger, B., Lacroix, C., Buisson, E., Borne, S., Parisi, L., Chandeysson, C. *et al.* (in prep., refer to chapter 2) Season and plant community composition influence the size and structure of *Pseudomonas syringae* populations on orchard ground covers.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792-1797.
- Ercolani, G.L., Hagedorn, D.J., Kelman, A., and Rand, R.E. (1974) Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean in Wisconsin. *Phytopathol* **64**: 1330-1339.
- Everett, K.R., and Henshall, W.R. (1994) Epidemiology and population ecology of kiwifruit blossom blight. *Plant Pathol* **43**: 824-830.
- Gagnard, J.L., and Luisetti, J. (1993) *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Agronomie* **13**: 333-370.
- Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, D.v., and Berg, G. (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* **321**: 235-257.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D. (1990) Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Ann Rev Phytopathol* **28**: 155-177.
- Humphrey, P.T., Nguyen, T.T., Villalobos, M.M., and Whiteman, N.K. (2014) Diversity and abundance of phyllosphere bacteria are linked to insect herbivory. *Mol Ecol* **23**: 1497-1515.
- Joliffe, I.T., and Morgan, B.J.T. (1992) Principal component analysis and exploratory factor analysis. *Stat Met Med Res* **1**: 69-95.
- King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* **44**: 301-307.
- Lambais, M.R., Lucheta, A.R., and Crowley, D.E. (2014) Bacterial community assemblages associated with the phyllosphere, dermosphere, and rhizosphere of tree species of the Atlantic forest are host taxon dependent. *Microb Ecol* **68**: 567-574.
- Lamichhane, J.R., Varvaro, L., Parisi, L., Audergon, J.-M., and Morris, C.E. (2014) Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: seeing the forest for the trees. *Ad Agro* **126**: 235-296.
- Latorre, B.A., and Jones, A.L. (1979) Evaluation of weeds and plant refuse as potential sources of inoculum of *Pseudomonas syringae* in bacterial canker of cherry. *Phytopathol* **69**: 1122-1125.
- Legendre, P., and Anderson, M.J. (1999) Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecol Monogr* **69**: 1-24.
- Lindow, S.E., and Brandl, M.T. (2003) Microbiology of the Phyllosphere. *App Env Microbiol* **69**: 1875-1883.
- Liu, P., Xue, S., He, R., Hu, J., Wang, X., Jia, B. *et al.* (2016) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated from non-kiwifruit plant species in China. *Euro J Plant Pathol* **145**: 743-754.
- Mabagala, R.B., and Saettler, A.W. (1992) The role of weeds in survival of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Northern Tanzania. *Plant Dis* **76**: 683-687.
- Malvick, D.K., and Moore, L.W. (1988a) Population dynamics and diversity of *Pseudomonas syringae* on maple and pear trees and associated grasses. *Phytopathol* **78**:1366-1370
- Malvick, D.K., and Moore, L.W. (1988b) Survival and dispersal of a marked strain of *Pseudomonas syringae* in a maple nursery. *Plant Pathol* **37**: 573-580.
- McArdle, B.H., and Anderson, M.J. (2001) Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecol* **82**: 290-297.
- McCullagh, P., and Nelder, J.A. (1989) *Generalized linear models*. New York: CRC press.
- Meaden, S., Metcalf, C.J.E., and Koskella, B. (2016) The effects of host age and spatial location on bacterial community composition in the English Oak tree (*Quercus robur*). *Env Microbiol Rep* **na**: na-na.

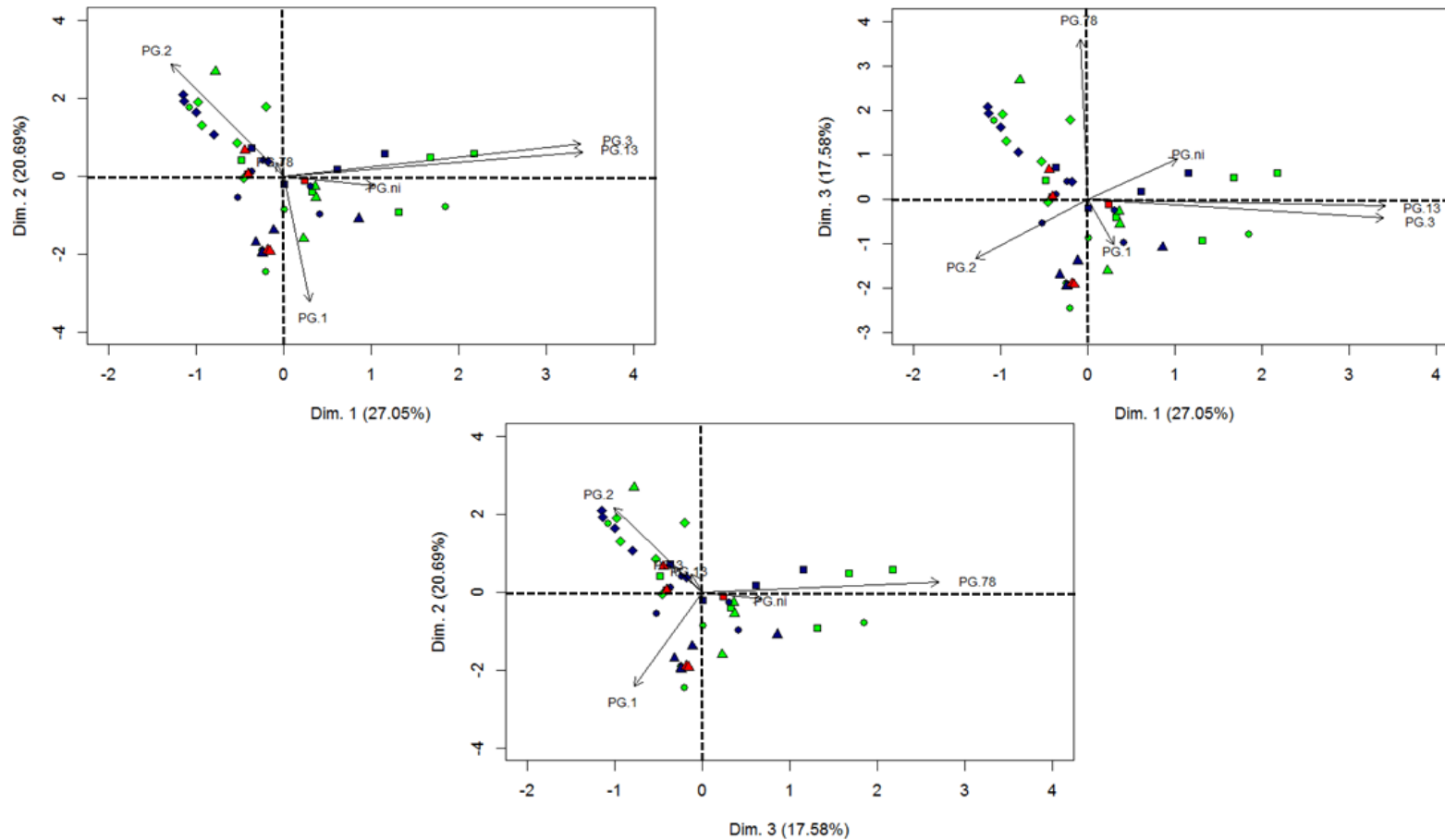
### PCA - Apricot ground covers



**Figure 10.** Schematic representation of coordinates of initial variables (Phylogroup abundances expressed as  $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$  of fresh matter. Abundances are calculated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population) and of associated observations (ground cover samples at T1 ■, T2 ■ and T3 ■, from apricot orchards P2  and P3 ▲) on the axes calculated by a principal component analysis (PCA). The graph axes are constituted by the first three PCA components (Dim. 1, 2 and 3) which illustrate 29.35 %, 21.62 %, and 17.82 % of the data set variability, respectively.

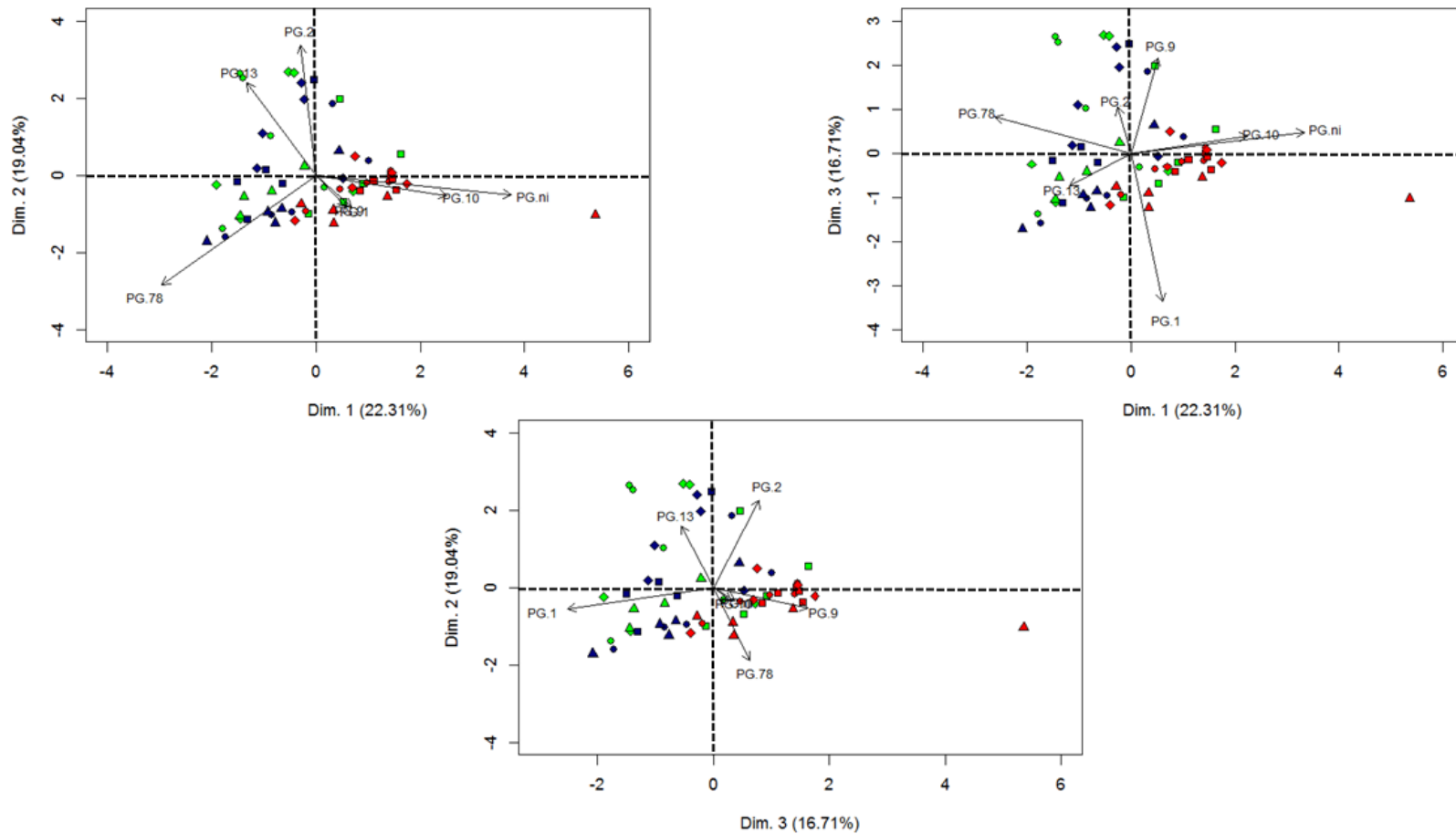
- Mohan, S.K., and Schaad, N.W. (1987) An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathol* **77**: 1390-1395.
- Monteil, C.L., Guilbaud, C., Glaux, C., Lafolie, F., Soubeyrand, S., and Morris, C.E. (2012) Emigration of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from leaf litter contributes to its population dynamics in alpine snowpack. *Env Microbiol* **14**: 2099-2112.
- Monteil, C.L., Lafolie, F., Laurent, J., Clement, J.-C., Simler, R., Travi, Y., and Morris, C.E. (2013) Soil water flow is a source of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in subalpine headwaters. *Env Microbiol* **16**: 2038-2052.
- Morris, C.E., Kinkel, L.L., Xiao, K., Prior, P., and Sands, D.C. (2007) Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infect Gen Evol* **7**: 84-92.
- Morris, C.E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffiere, A. *et al.* (2008) The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J* **2**: 321-334.
- Pinheiro, J.C., and Bates., D. (2000) *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. New York: Springer.
- Redford, A.J., Bowers, R.M., Knight, R., Linhart, Y., and Fierer, N. (2010) The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Env Microbiol* **12**: 2885-2893.
- Rees-George, J., Vanneste, J.L., Cornish, D.A., Pushparajah, I.P.S., Yu, J., Templeton, M.D., and Everett, K.R. (2010) Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathol* **59**: 453-464.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725-2729.
- Team, R.C. (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015. URL <http://www.R-project.org>.
- Tyson, J.L., Rees-George, J., Curtis, C.L., Manning, M.A., and Fullerton, R.A. (2012) Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on the orchard floor over winter. *N Zea Plant Prot* **65**: 25-28.
- Vanneste, J.L., Moffat, B.J., and Oldham, J.M. (2012) Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on *Cryptomeria japonica*, a non-host plant used as shelter belts in kiwifruit orchards. *N Zea Plant Prot* **65**: 1-7.
- Vanneste, J.L., Poliakov, F., Audusseau, C., Cornish, D.A., Paillard, S., Rivoal, C., and Yu, J. (2014) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in France. *Plant Dis* **95**: 1311-1311.
- Vorholt, J.A. (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* **10**: 828-840.
- Wilkie, J.P., Dye, D.W., and Watson, D.R.W. (1973) Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. *N Zea J Agri Res* **16**: 315-323.
- Young, J.M., Cheesmur, G.J., Welham, F.V., and Henshall, W.R. (1988) Bacterial blight of kiwifruit. *Ann Appl Biol* **112**: 91-105.

### PCA - Kiwifruit vines

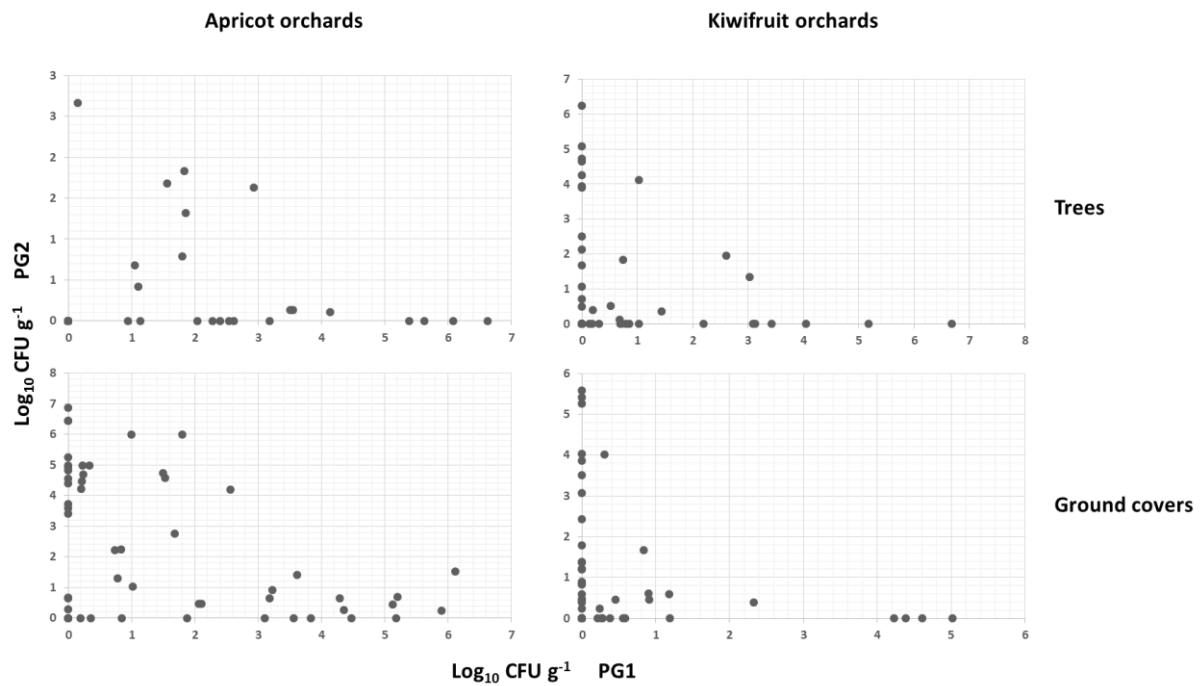


**Figure 11.** Schematic representation of coordinates of initial variables (Phylogroup abundances expressed as  $\log_{10}$  CFU  $g^{-1}$  of fresh matter. Abundances are calculated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population) and of associated observations (bud samples at T1 ■ and T2 ■, and twig samples at T3 ■ respectively, from kiwifruit orchards K1 ○, K2 □, K3 ◇ and K4 △) on the axes calculated by a principal component analysis (PCA). The graph axes are constituted by the first three PCA components (Dim. 1, 2 and 3) which illustrate 27.05 %, 20.69 %, and 17.58 % of the data set variability, respectively.

### PCA - Kiwifruit ground covers



**Figure 12.** Schematic representation of coordinates of initial variables (Phylogroup abundances expressed as  $\log_{10}$  CFU  $\text{g}^{-1}$  of fresh matter. Abundances are calculated for each phylogroup as a percentage of the entire *P. syringae* population) and of associated observations (ground cover samples at T1 ■, T2 ■ and T3 ■, from kiwifruit orchards K1 , K2 , K3  and K4 ) on the axes calculated by a principal component analysis (PCA). The graph axes are constituted by the first three PCA components (Dim. 1, 2 and 3) which illustrate 22.31 %, 19.04 %, and 16.71 % of the data set variability, respectively



**Figure 13.** Pairwise comparisons of phylogroups 1 (PG1) and 2 (PG2) abundances over all data for trees and ground covers from apricot and kiwifruit orchards. Phylogroup abundances are expressed in  $\log_{10}$  CFU  $\text{g}^{-1}$  of fresh matter.

**Table S1.** Summary of the putative *P. syringae* isolates used during this study, related information and PCR results (Tab1), and *cts* reference sequences used for phylogenetic trees (Tab2).

## Chapitre 4

---

**Tentative d'ingénierie écologique appliquée aux communautés  
végétales du couvre-sol dans un objectif de réduction de  
l'abondance des *P. syringae***



## I. Contexte

Les résultats obtenus dans le cadre de l'étude des populations de *P. syringae* associées aux plantes couvre-sol du chapitre 2 ont permis de montrer l'existence d'un lien entre la structure des populations de *P. syringae* et la composition des communautés de plantes. L'un des principaux résultats est la mise en évidence d'une diminution de l'abondance des *P. syringae* en présence de *Prunella vulgaris*, une plante de la famille des Lamiaceae. Il s'agit d'une espèce pour laquelle l'existence d'un pouvoir antimicrobien a été démontré lors d'essais *in vitro* (Psotova *et al.*, 2003 ; Sarac and Ugur, 2007 ; Kirbag *et al.*, 2009). Cependant, aucune information n'est disponible quant à l'effet de *P. vulgaris* sur des communautés microbiennes *in situ*.

## II. Objectif

L'objectif principal de ce quatrième chapitre est de voir s'il est possible de reproduire le résultat observé à partir des échantillons de terrain du chapitre 2, c'est-à-dire une réduction de l'abondance de *P. syringae* en présence de *P. vulgaris*. Une parcelle expérimentale renfermant un couvre-sol végétal, constitué d'un mélange de *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne* et *Trifolium repens*, a été semée à l'automne 2015. Cette parcelle a été randomisée en cinq blocs renfermant chacun quatre sous-parcelles de 2 x 2 mètres au sein desquelles ont été transplantées 0, 5, 15 ou 30 % de plantes de *P. vulgaris*. De plus, dans le cadre de cette étude on vérifie si un potentiel effet inhibiteur de *P. vulgaris*, par libération de composés antimicrobiens lors du traitement des échantillons, aurait pu être à l'origine des dénombrements bactériens plus faibles observés dans le cadre du chapitre 2. Enfin, le nombre

de bactéries pouvant potentiellement immigrer sur les plantes couvre-sols, et donc aussi sur les arbres fruitiers, via les particules aérosols présentes dans l'air au-dessus de la parcelle est évalué à l'aide de dénombrements bactériens sur boîtes de pétri exposées au-dessus de la canopée des plantes couvre-sol.

### III. Résultats principaux

La présence de *P. vulgaris*, y compris lorsqu'elle représente une part importante de la communauté des plantes couvre-sol, ne diminue pas de façon significative l'abondance des populations de *P. syringae*. Le couvre-sol expérimental est implanté depuis moins d'une année et il est possible que la maturation des plantes ne soit pas terminée et que les communautés bactériennes ne se soient pas encore stabilisées. Il s'agit de résultats préliminaires d'un projet pensé sur le long terme. Effectivement les couvre-sols des vergers sont généralement implantés depuis plusieurs années et tondus à intervalles réguliers. A la fin de ma thèse, le suivi de l'abondance des populations de *P. syringae* sera reconduit par les membres de mon équipe d'accueil afin d'évaluer si oui ou non *P. vulgaris* peut diminuer l'abondance de *P. syringae* après une phase d'installation et de maturation. De plus, les résultats montrent que les abondances de *P. syringae* d'échantillons de plantes couvre-sol broyées séparément ou en présence de *P. vulgaris* sont similaires, ce qui indique que les abondances de *P. syringae* plus faibles observées dans le chapitre 2 ne sont donc pas un biais de traitement des échantillons. Enfin, les captures aériennes indiquent qu'environ  $10^7$  *P. syringae* par hectare et par heure peuvent immigrer sur les plantes couvre-sol et les arbres fruitiers via des particules aérosols.

## Résultats préliminaires d'un projet en cours

### **An ecological engineering trial applied to ground cover plant communities in an effort to reduce the abundance of *Pseudomonas syringae***

#### **Introduction**

Ecological engineering, “the design of sustainable ecosystems that integrate human society with its natural environment for the benefit of both” (Mitsch, 2012), is widely used to enhance orchard pest control. For example, it is possible to modulate populations of herbivores, disease vectors, pollinators, predatory and parasitoid arthropods by changing the orchard ground cover plant communities (Simon *et al.*, 2010). Applying the principles of ecological engineering to ground cover plant communities could also potentially be a means to control microbial communities responsible for crop diseases by enhancing antagonistic microbes or using plant species that are unfavorable for the establishment of certain species of pathogens. Indeed, some plant species have antimicrobial properties (Deans and Ritchie, 1987; Nychas, 1995), and one might assume that they could potentially influence the microbial community in their immediate environment. Work presented in chapter 2 in this thesis has shown that the abundance and structure of *P. syringae* populations are correlated to ground cover plant communities, and that percent cover of some plant families and species are correlated to changes in these parameters of *P. syringae* populations. For example, it was shown that increasing percent cover of *Prunella vulgaris*, a plant species in the Lamiaceae family, is

correlated to a decrease in *P. syringae* abundances (Borschinger *et al.*, in prep., refer to chapter 2). Furthermore, previous studies have demonstrated that *P. vulgaris* contains antimicrobial compounds that could slow down and/or inhibit the growth of some bacterial species including *P. aeruginosa* (Psotova *et al.*, 2003; Sarac and Ugur, 2007; Kirbag *et al.*, 2009), thereby the negative correlation between *P. vulgaris* percent cover and *P. syringae* abundances could be a direct causal effect. However, the reproducibility of this effect must be investigated, for example by assessing *P. syringae* abundances in experimental ground cover plots with and without *P. vulgaris* in their plant community.

Here I describe results of experiments to introduce *P. vulgaris* in a typical orchard ground cover composed by a mixture of *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne* and *Trifolium repens*, and in particular the effect on the abundances of total bacterial and *P. syringae* populations. This experiment could help to better understand if the negative correlation between *P. vulgaris* percent cover and *P. syringae* abundance observed previously is reproducible, or if other not yet known factors are involved in the decrease of *P. syringae* population abundances. Furthermore, as *P. vulgaris* contains antimicrobial compounds it is possible that processing ground cover plant samples along with *P. vulgaris* result in lower *P. syringae* counts on culture media compared to samples processed without *P. vulgaris* because of the antimicrobials released during maceration of plant tissue. This could be easily assessed by comparing *P. syringae* abundances from single plant species with those from plant species processed along with *P. vulgaris*. Finally, such a field experiment could also allow quantification of the number of *P. syringae* bacterial cells present in the air masses above ground covers and representing a potential immigration and inoculum source for fruit trees.



**Figure 1.** Map of experimental field map with localization of the 0, 5, 15 and 30 % *P. vulgaris* percent cover plots within the five blocks.

## Materials and methods

### Location and setup of the experimental ground cover plots

The ground cover plots were installed in an experimental field at the Plant Pathology research unit of the INRA PACA center in Montfavet.

Taking into account the surroundings of the experimental field that could potentially alter ground cover plant growth and associated bacterial communities, *i.e.* the presence of greenhouses, a pathway and a cypress hedge, the field was set up for a randomized complete block design by subdividing the field into five blocks of 4 m<sup>2</sup> ground cover plots delimited by plastic stakes. The plots were 2 x 2 m and were separated from each other's by border rows that were 1 m wide. The edges of the experimental fields were 3 m apart at both ends, and 1 m at each side, from the ground cover plots.

Prior to ground cover seeding, the experimental field was irrigated and plowed several times in order to foster and speed up weed seed germination and ease weed removal.

Ground cover consisting of a mixture of *F. arundinacea*, *L. perenne*, and *T. repens* at about 360, 530 and 190 seeds per m<sup>2</sup>, respectively, was sown on the whole surface of the field at the beginning of September 2015. In three randomly chosen plots per block *P. vulgaris* seeds were added in order to obtain *P. vulgaris* plants that would cover about 5, 15 or 30 % of the plot area. Plots without *P. vulgaris* (referred to as 0 % plots) were used as control plots. Irrigation was carried out by rotary sprinklers located along the corridor between the second and third blocks (Figure 1). Previous germination tests conducted in greenhouse showed that *P. vulgaris* had a germination rate of about 50 %, thereby twice of the initially planned amount of *P. vulgaris* seeds were sown in the different plots described previously, *i.e.* about 110, 330

and 660 *P. vulgaris* seeds per m<sup>2</sup>, respectively for the 5, 15 and 30 % plots. However, after a few weeks it appeared that *P. vulgaris* plants grew very slowly in comparison with the three other plant species, and that competition was too high to obtain *P. vulgaris* plants that cover up to 30 % of the plot areas. For this reason, *P. vulgaris* plants were grown in greenhouse in winter 2015, and plants were transplanted in the 5, 15 and 30 % plots at the end of February 2016. After a few weeks, these transplanted *P. vulgaris* plants were well established and could compete with the other ground cover plant species. Pictures of the whole implementation process of the experimental field are visible in Supplementary Data.

#### **Assessment of the impact of *P. vulgaris* on bacterial community abundances**

For bacterial quantification, three samples (called A, B and C) were collected in each plot a first time on 7 and 8 April 2016, and a second time on 15 June 2016. Ground cover plots were mowed once between the two sampling dates, as it is the standard ground cover management in orchards. The samples consisted of bulks of about 6 g ground cover plants collected while avoiding to collect *P. vulgaris* plant tissues. *P. vulgaris* was avoided in order to assess its specific effect on bacterial populations, as described further below. The samples were collected by using scissors and gloves that were sterilized with 70 % alcohol between each sample. Along with ground cover sample collection, the exact percent cover of the three sown plant species, *P. vulgaris*, other plant species, litter and bare ground were evaluated in three 1 m<sup>2</sup> squares in each plot, corresponding to the locations where samples were collected. The samples were stomached for four minutes in 25 mL sterile phosphate buffer (8.75 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 6.75 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 L distilled water). Ten-fold dilutions of washings were then plated on two culture media: 20μL onto 10 % TSA with cycloheximide (3 g tryptone soy



**Figure 2.** Device used for bacterial immigration rate assessments: petri dishes containing TSA or KBC medium exposed at ground cover canopy height within the 0 and 30% *P. vulgaris* plots.



broth and 15 g of agar in 1 L of distilled water, 50 mg L<sup>-1</sup> cycloheximide) to assess the size of the total culturable bacterial community, and 100 µL onto modified King's B medium (KBC) for the specific isolation of *P. syringae* (Mohan and Schaad, 1987). KBC as used in this study was composed of 9 volumes of King's B medium (KB) (King *et al.*, 1954) with a smaller quantity of proteose peptone than the original recipe (1.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 15 g proteose-peptone, 10 mL glycerol and 15 g agar in 900 mL distilled water), and 1 volume of boric acid (1.5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> in 100 mL distilled water), and contains cycloheximide (50 mg L<sup>-1</sup>) and cephalixin (80 mg L<sup>-1</sup>). The culture media were incubated at 25°C for 48 - 72 hours. After incubation, total bacterial and *P. syringae* abundances were assessed, and for each sample 30 putative *P. syringae* colonies based on morphological criteria of the colonies such as size, color, reflection of light, and roughness of the edge of the colonies were stored in sterile phosphate buffer containing 20 % of glycerol and were kept at -20 °C.

### **Investigation of the number of bacterial immigrants on ground cover plants arriving via aerosol particles**

To quantify the number of bacterial immigrants that could deposit on ground cover plants via aerosol particles two experiments were conducted in addition to the quantification of the bacterial populations on ground cover plants. The quantifications were carried out on sunny days, with wind speed not exceeding 3 m s<sup>-1</sup>, over an eight-hour period from 11 am to 7 pm. Immigration rates were assessed by the number of colonies that were deposited on the surface of solid culture medium in petri dishes exposed at plant canopy height, *i.e.* about 30 cm above the ground, in the five 0 and 30 % plots (Figure 2). Colonies forming on these plates would represent bacteria that deposit on leaves via deposition. Each hour the petri dishes

were renewed to avoid desiccation. The first immigration rate assessments were done on 14 April 2016. During this first experiment, only the immigration rates of putative *P. syringae* were carried out by using 60.8 cm<sup>2</sup> KBC petri dishes. The petri dishes consisted of a bottom layer of about 20 mL of water agar and a top layer of about 20 mL KBC as described previously. This two-layer method was used to fill plates so as to minimize disruption of airflow by the edges of the petri dishes. Two replicates were carried out each hour in each plot. The second immigration rate assessments were carried out on 24 June 2016, and total bacterial immigration rates were also investigated, by using TSA medium, in addition to those of putative *P. syringae*. Two replicates were carried out each hour, in each plot and for each medium.

Petri dishes were incubated at room temperature (about 25 °C) for 48 - 72 hours before counting bacterial colonies.

### **Testing the effect of the presence of *P. vulgaris* in samples during sample processing on bacterial abundances**

On 4 July 2016, *F. arundinacea*, *L. perenne*, *T. repens* and *P. vulgaris* plant tissue samples were collected in each of the 30 % plots, *i.e.* plots 4, 5, 10, 15 and 18 (Figure 1), in order to assess the effect of stomaching *P. vulgaris* with other plant species on microbial abundances. In each plot, bacterial abundances were assessed in two replicates for each individual plant species and mixtures of each plant species with *P. vulgaris* tissues. Samples were stomached in 25 mL sterile phosphate buffer for 4 min, and ten-fold dilutions of washings were plated on the two previously described culture

media, *i.e.* 20  $\mu\text{L}$  on TSA and 100  $\mu\text{L}$  on KBC. The culture media were incubated at room temperature (about 25 °C) for 48 - 72 hours before counting bacterial colonies.

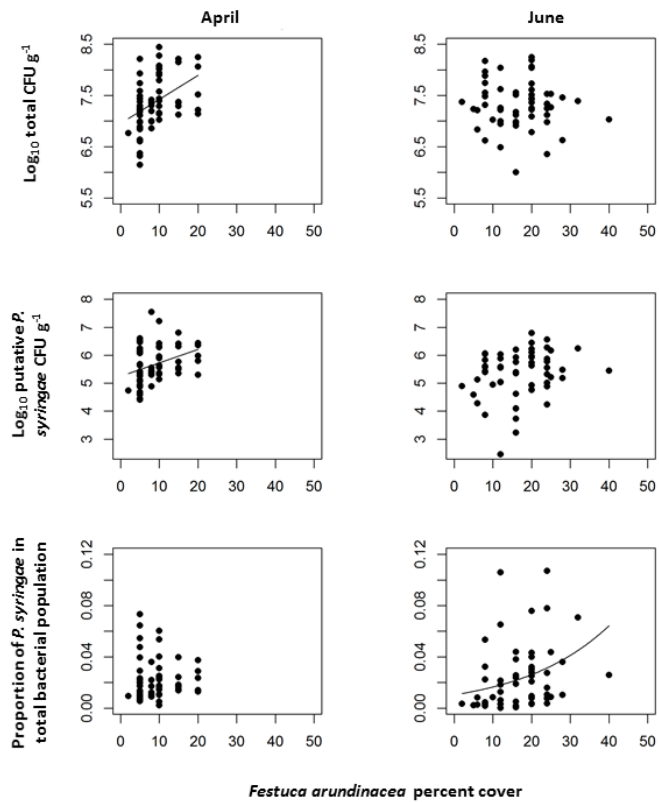
### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using R version 3.2.2 (R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria) (R Core Team, 2016).

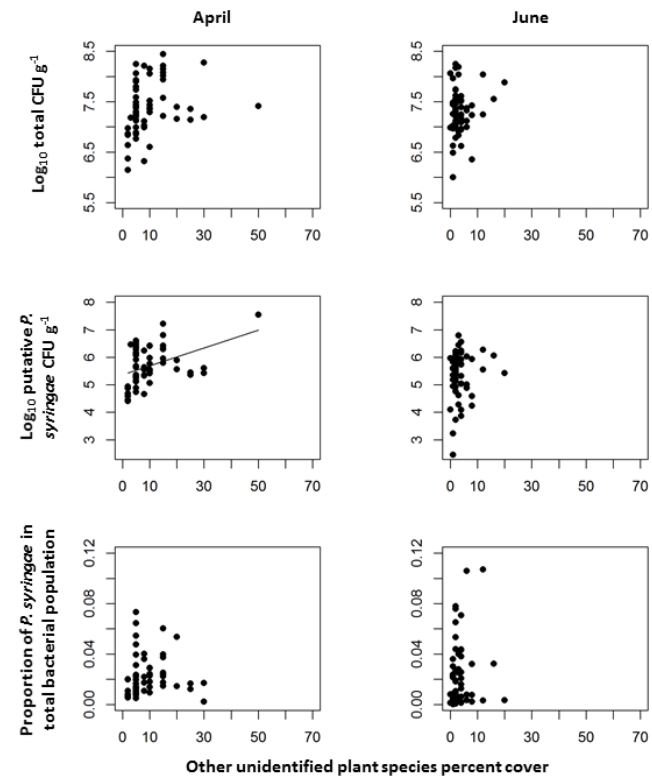
First, we tested the effect of the abundance (*i.e.* percent cover) of the different plant species on changes in i) the absolute abundances of total bacterial community and *P. syringae* population (expressed as  $\log_{10}$  CFU per gram of fresh plant material) using linear mixed-effect models in the R nlme library, and ii) the proportion of *P. syringae* relative to the abundance of the total culturable bacterial community (*i.e.* relative abundance) using generalized linear mixed-effect models and a logistic regression in the R lme4 library. All linear mixed-effect and generalized linear mixed-effect models included plot identification as a random effect to control for variation among plots.

Second, we tested the effect of processing plant tissue samples along with *P. vulgaris* tissues on changes in *P. syringae* abundances by using linear models, and generalized linear models, respectively for absolute and relative abundances.

In all analyzes, a p-value < 0.05 was considered statistically significant. Significant results were verified by graphic visualization: when outliers were observed, statistical tests were performed again without the outliers in order to determine their influence on the significance of the results.



**Figure 3.** Total bacterial and putative *P. syringae* abundances (means and standard errors) according to *F. arundinacea* percent cover in April and June 2016.



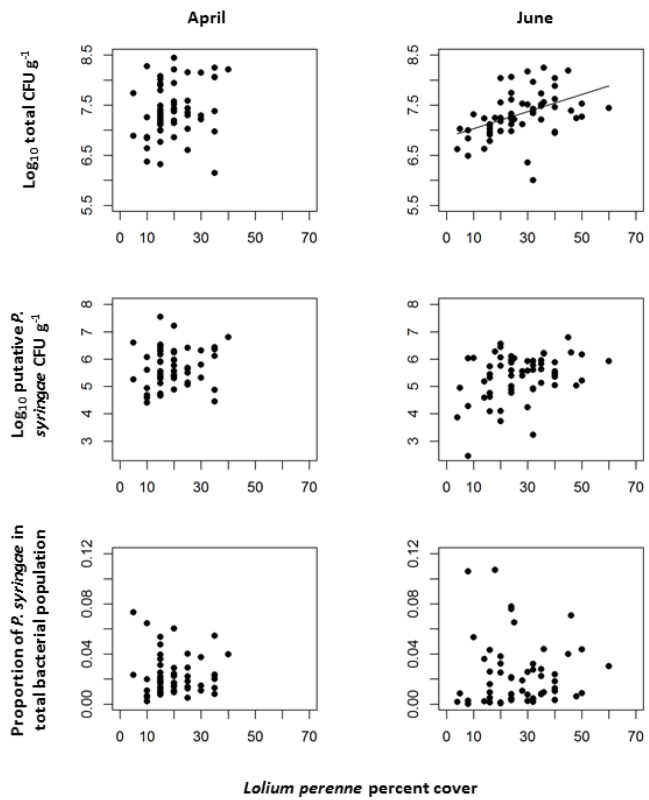
**Figure 4.** Total bacterial and putative *P. syringae* abundances (means and standard errors) according to other plant species percent cover in April and June 2016.

## Results

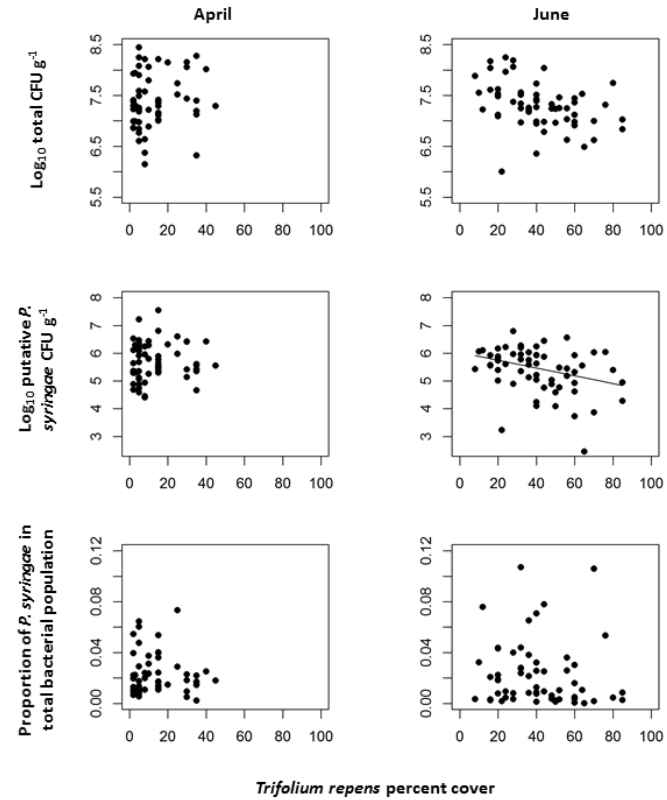
### ***P. vulgaris* abundance is not correlated to a decrease of *P. syringae* abundances**

Overall at both ground cover sampling dates, absolute abundances of total bacterial community and *P. syringae* population were about  $10^6$  to  $10^8$  and  $10^4$  to  $10^7$ , respectively, and *P. syringae* never exceeded 12 % of the total bacterial community (Table 1). Percent cover of the three sown plant species, *P. vulgaris*, volunteer weed species, bare ground and litter are summarized in Table 2. The three sown plant species, and *P. vulgaris* in the 5, 15 and 30 % plots, represented the dominant part of the ground cover plant community. At first sampling date, another *Trifolium* species represented a dominant part of the plant community. This *Trifolium* species was referred to as local *Trifolium*. At the second sampling date the local *Trifolium* almost completely disappeared due to the presence of some herbivore insect species. Other plant species and bare ground rarely exceeded 10 % cover. According to low percent cover and species identification difficulties, these other plant species were grouped under “other” in Table 2 and figures. Furthermore, litter was only present at the second sampling due to plot mowing a few weeks earlier, but rarely exceeded 5 % coverage.

At the first sampling in April, the increase of *F. arundinacea* percent cover was correlated to an increase of total bacterial and *P. syringae* absolute abundances (p-value = 0.015 and 0.012, respectively, Figure 3). Moreover, the increase of unidentified plant species percent cover was correlated to an increase of *P. syringae* absolute abundance (p-value = 0.001, Figure 4).



**Figure 5.** Total bacterial and putative *P. syringae* abundances (means and standard errors) according to *L. perenne* percent cover in April and June 2016.



**Figure 6.** Total bacterial and putative *P. syringae* abundances (means and standard errors) according to *T. repens* percent cover in April and June 2016.

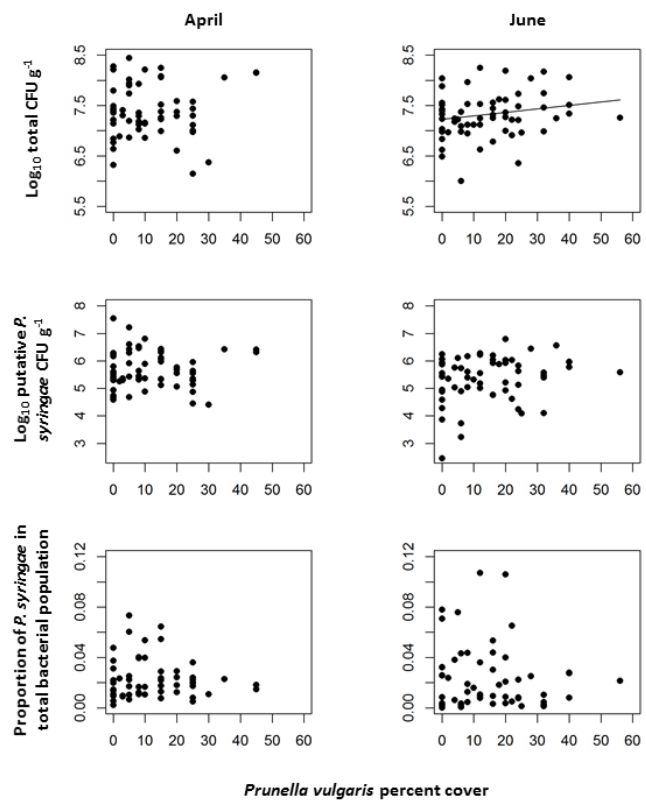
At the second sampling in June, the increase of *L. perenne* percent cover was correlated to an increase of the total bacterial abundance (p-value = 0.001, Figure 5). Moreover, the increase of *F. arundinacea* percent cover was correlated to an increase of *P. syringae* relative abundance (p-value = 0.034, Figure 3), whereas the increase of *T. repens* percent cover was correlated to a decrease of *P. syringae* absolute abundance (p-value = 0.016, Figure 6).

*P. vulgaris* percent cover was correlated to an increase of total bacterial abundance (p-value = 0.027, Figure 7) at the second sampling, but was not correlated to a decrease of *P. syringae* abundances, as expected, at the first nor at the second sampling (p-values > 0.05, Figure 7).

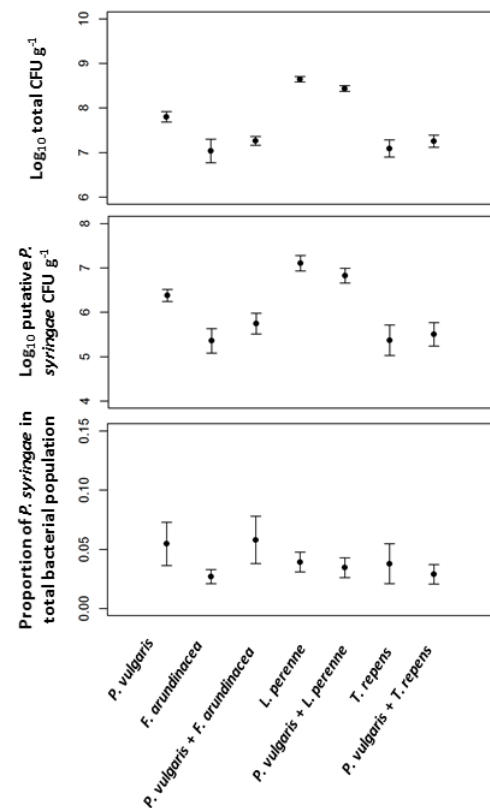
In all other cases, no correlation was found between percent cover and total bacterial and *P. syringae* abundances (p-values > 0.05).

#### **Processing plant tissues along with *P. vulgaris* tissues does not affect total bacterial nor *P. syringae* abundances**

Overall, total bacterial and *P. syringae* absolute abundances from *F. arundinacea*, *L. perenne*, *T. repens*, and mixtures of these species along with *P. vulgaris* vary about  $10^6$  to  $10^8$  and  $10^4$  to  $10^7$ , respectively, and *P. syringae* never exceeded 10 % of the total bacterial abundance (Figure 8, Table 3). Statistical analyzes show that simultaneously processing plant tissue samples along with *P. vulgaris* tissues had no effect on total bacterial and *P. syringae* abundances (p-values > 0.05).



**Figure 7.** Total bacterial and putative *P. syringae* abundances (means and standard errors) according to *P. vulgaris* percent cover in April and June 2016.



**Figure 8.** Total bacterial and putative *P. syringae* abundances (means and standard errors) on *P. vulgaris*, *F. arundinacea*, a mixture of *P. vulgaris* and *F. arundinacea*, *L. perenne*, a mixture of *P. vulgaris* and *L. perenne*, *T. repens* and a mixture of *P. vulgaris* and *T. repens*.



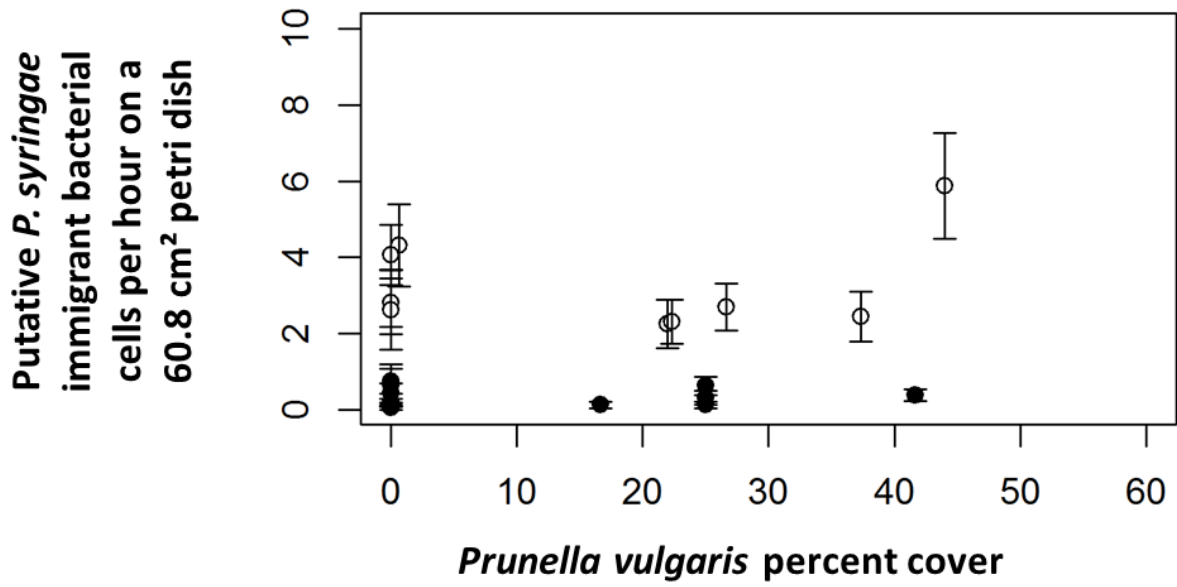
### **About $10^7$ *P. syringae* ha<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> immigrate to ground cover plants via aerosol particles**

The first sampling in April showed that on average less than two putative *P. syringae* bacterial cells were deposited on the KBC petri dishes per hour. This represent an immigration rate about  $10^6$  putative *P. syringae* bacterial cells ha<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Table 4). This estimate of immigration rate does not take into account the further destiny of the immigrants which likely would be different on a leaf than on medium in a Petri dish.

The second sampling in June showed that about 60 to 150 bacterial cells were deposited on the TSA petri dishes each hour representing about  $10^8$  bacterial cells ha<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, and about 2 to 6 putative *P. syringae* bacterial cells were deposited on KBC petri dishes each hour representing about  $10^6$  to  $10^7$  putative *P. syringae* cells ha<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Table 4). Overall, putative *P. syringae* bacterial cell immigration rates were higher in June compared to those of April, and no effect between putative *P. syringae* bacterial cell immigration rates and *P. vulgaris* percent cover could be demonstrated. Putative *P. syringae* bacterial cell immigration rates were represented according to *P. vulgaris* percent cover (Figure 9).

## **Discussion**

To our knowledge this is the first attempt of ecological engineering applied to ground cover plant communities to control their associated bacterial communities. As shown previously by Borschinger *et al.* (in prep., refer to chapter 2) total bacterial and *P. syringae* abundances are correlated to ground cover plant community density and composition, nonetheless no consistent tendencies could be revealed across samplings indicating the involvement of other not yet known factors. Because of our observations in commercial orchards we expected an effect of *P. vulgaris* on *P. syringae* populations. However, no significant differences could be



**Figure 9.** Putative *P. syringae* immigrant bacterial cells (means and standard errors) arriving on a 60.8 cm<sup>2</sup> petri dish per hour according to *P. vulgaris* percent cover on April (●) and June (○) 2016.

observed between *P. syringae* abundances in plots with *P. vulgaris* and those from plots without *P. vulgaris*. Even if *P. vulgaris* contains antimicrobial compounds they seem not able to influence the bacterial communities from their immediate surroundings. However, other possibilities are that these *P. vulgaris* plants are not enough mature to release antimicrobial compounds in sufficient quantities to impact surrounding bacterial communities, or that regular mowing and *P. vulgaris* tissue break down are involved in the release of antimicrobial compounds. At the time of first sampling the *P. vulgaris* plants had been established for less than two months, and somewhat more than three months at the second sampling. Furthermore, plots were mowed only once between the two samplings resulting in a small amount of decaying plant litter. Maybe, *P. syringae* abundances should be investigated over a longer period of time after ground cover establishment, and several mowings, to ensure more similar conditions to that from orchard ground covers. The plots we established will be maintained so that the effect of time can be assessed in future work.

Furthermore, in the previous study by Borschinger *et al.* (in prep., refer to chapter 2) the ground cover samples consisted of bulks of several grams of plant leaves among which *P. vulgaris* leaves were present. We assessed the hypothesis that processing ground cover plant samples along with *P. vulgaris* may be responsible for the release of antimicrobial compounds and thus for reduced bacterial growth on culture media, resulting in lower bacterial colony counts. However, here we show that *P. syringae* abundances from single plant species are similar to those from mixtures of these plant species processed along with *P. vulgaris*, thereby the previous observations made by Borschinger *et al.* (in prep., refer to chapter 2) were not biased by sample processing.

Ecological engineering of ground cover plant communities seems to be a possible leverage to control bacterial population behaviors, *i.e.* abundances and structures. However, the current

results show contrasting trends that could not be explained simply by the presence or absence of certain plant species. The observed fluctuations in total bacterial and *P. syringae* abundances are probably the result of complex interactions among plants, the physico-chemical properties of the soils, environmental conditions such as temperature and humidity, surrounding plant species and ground cover management practices (mowing frequencies, mowing height, etc.). Further investigations are needed to identify the plant species that are correlated to bacterial abundance modifications and under which environmental conditions these modifications occurs. Identifying plant species, ground cover management practices and environmental conditions that affect significantly bacterial communities could lead to new ecological engineering practices applicable to orchards and other crops in interactions with ground covers and weeds hosting pathogenic bacterial communities.

## References

- Borschinger, B., Lacroix, C., Buisson, E., Borne, S., Parisi, L., Chandeysson, C. *et al.* (in prep., refer to chapter 2) Season and plant community composition influence the size and structure of *Pseudomonas syringae* populations on orchard ground covers.
- Deans, S.G., and Ritchie, G. (1987) Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J Food Microbiol* **5**: 165-180.
- Nychas GJE. Natural antimicrobials from plants. In: *New Method Food Preservation*. Gould, G.W. (ed.). Springer US, 1995, pp. 58-89.
- King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* **44**: 301-307.
- Kirbag, S., Zengin, F., and Kursat, M. (2009) Antimicrobial activities of extracts of some plants. *Pak. J. Bot* **41**: 2067-2070.
- Mitsch, W.J. (2012) What is ecological engineering? *Ecol Eng* **45**: 5-12.
- Mohan, S.K., and Schaad, N.W. (1987) An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathol* **77**: 1390-1395.
- Psotova, J., Kolar, M., Sousek, J., Svagera, Z., Vicar, J., and Ulrichova, J. (2003) Biological activities of *Prunella vulgaris* extract. *Phytother Res* **17**: 1082-1087.
- Sarac, N., and Ugur, A. (2007) Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsian J BioSci* **4**: 28-37.

Simon, S., Bouvier, J.-C., Debras, J.-F., and Sauphanor, B. (2010) Biodiversity and pest management in orchard systems. A review. *Agron Sustain Dev* **30**: 139-152.

R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015. URL <http://www.R-project.org>.

**Table 1.** Bacterial abundances on 7 April and 15 June 2016. At both dates, three bulk ground cover samples were collected, without including *P. vulgaris*, in each plot.

Sampling date	Plot	Rep	Total bacterial abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Putative <i>P. syringae</i> abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>
07/04/2016	1	A	7,36	5,44
07/04/2016	1	B	8,02	6,42
07/04/2016	1	C	7,20	5,43
07/04/2016	2	A	7,44	5,13
07/04/2016	2	B	7,29	5,55
07/04/2016	2	C	7,52	5,98
07/04/2016	3	A	8,28	5,61
07/04/2016	3	B	7,44	5,41
07/04/2016	3	C	7,40	5,56
07/04/2016	4	A	7,57	5,95
07/04/2016	4	B	7,00	5,56
07/04/2016	4	C	7,11	5,35
07/04/2016	5	A	8,06	6,42
07/04/2016	5	B	8,15	6,32
07/04/2016	5	C	8,15	6,41
07/04/2016	6	A	7,29	5,32
07/04/2016	6	B	7,03	5,63
07/04/2016	6	C	7,12	5,35
07/04/2016	7	A	8,08	6,32
07/04/2016	7	B	7,16	5,89
07/04/2016	7	C	7,14	5,36
07/04/2016	8	A	6,32	4,66
07/04/2016	8	B	7,41	7,55
07/04/2016	8	C	8,21	6,24
07/04/2016	9	A	7,14	5,29
07/04/2016	9	B	7,22	5,79
07/04/2016	9	C	7,36	5,50
07/04/2016	10	A	7,30	5,64
07/04/2016	10	B	6,97	4,87

Sampling date	Plot	Rep	Total bacterial abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Putative <i>P. syringae</i> abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>
07/04/2016	10	C	6,15	4,45
07/04/2016	11	A	7,90	5,91
07/04/2016	11	B	6,89	5,25
07/04/2016	11	C	7,74	6,60
07/04/2016	12	A	6,99	5,33
07/04/2016	12	B	6,86	4,88
07/04/2016	12	C	7,18	6,47
07/04/2016	13	A	8,06	6,43
07/04/2016	13	B	8,25	6,36
07/04/2016	13	C	7,37	5,76
07/04/2016	14	A	6,84	4,58
07/04/2016	14	B	6,64	4,93
07/04/2016	14	C	7,21	5,35
07/04/2016	15	A	7,24	5,12
07/04/2016	15	B	7,26	6,07
07/04/2016	15	C	7,59	5,68
07/04/2016	16	A	6,86	4,69
07/04/2016	16	B	7,31	5,29
07/04/2016	16	C	7,41	5,36
07/04/2016	17	A	8,44	7,22
07/04/2016	17	B	8,21	6,81
07/04/2016	17	C	7,94	6,29
07/04/2016	18	A	6,37	4,41
07/04/2016	18	B	6,60	5,07
07/04/2016	18	C	6,99	5,28
07/04/2016	19	A	7,23	5,34
07/04/2016	19	B	7,38	6,11
07/04/2016	19	C	7,93	6,53
07/04/2016	20	A	7,79	6,29
07/04/2016	20	B	7,49	6,16
07/04/2016	20	C	6,77	4,74
15/06/2016	1	A	7,96	5,61
15/06/2016	1	B	6,00	4,23
15/06/2016	1	C	7,37	4,90
15/06/2016	2	A	7,46	5,47
15/06/2016	2	B	7,74	5,40
15/06/2016	2	C	7,25	4,77
15/06/2016	3	A	7,02	4,95
15/06/2016	3	B	6,83	4,28
15/06/2016	3	C	7,24	4,59
15/06/2016	4	A	6,96	4,09
15/06/2016	4	B	7,00	6,02
15/06/2016	4	C	6,91	4,62

Sampling date	Plot	Rep	Total bacterial abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Putative <i>P. syringae</i> abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>
15/06/2016	5	A	7,34	5,78
15/06/2016	5	B	7,24	6,56
15/06/2016	5	C	7,26	5,59
15/06/2016	6	A	7,53	5,55
15/06/2016	6	B	7,25	6,28
15/06/2016	6	C	6,62	5,18
15/06/2016	7	A	8,04	6,44
15/06/2016	7	B	7,12	5,32
15/06/2016	7	C	7,31	6,04
15/06/2016	8	A	7,51	5,92
15/06/2016	8	B	6,49	3,45
15/06/2016	8	C	6,62	3,87
15/06/2016	9	A	7,39	6,24
15/06/2016	9	B	7,43	5,93
15/06/2016	9	C	7,33	4,89
15/06/2016	10	A	8,06	5,97
15/06/2016	10	B	7,51	5,96
15/06/2016	10	C	6,98	4,10
15/06/2016	11	A	6,94	5,04
15/06/2016	11	B	7,24	5,03
15/06/2016	11	C	6,98	4,72
15/06/2016	12	A	7,61	5,93
15/06/2016	12	B	7,12	5,01
15/06/2016	12	C	6,78	4,76
15/06/2016	13	A	8,19	6,79
15/06/2016	13	B	7,44	5,92
15/06/2016	13	C	7,36	4,93
15/06/2016	14	A	6,97	5,35
15/06/2016	14	B	6,98	5,87
15/06/2016	14	C	7,03	5,44
15/06/2016	15	A	7,73	5,62
15/06/2016	15	B	7,22	6,03
15/06/2016	15	C	7,27	5,21
15/06/2016	16	A	7,22	6,10
15/06/2016	16	B	7,09	5,73
15/06/2016	16	C	7,17	5,76
15/06/2016	17	A	7,53	6,17
15/06/2016	17	B	8,25	6,22
15/06/2016	17	C	7,12	5,39
15/06/2016	18	A	8,17	5,57
15/06/2016	18	B	7,48	5,83
15/06/2016	18	C	7,21	5,12
15/06/2016	19	A	7,56	6,20

Sampling date	Plot	Rep	Total bacterial abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Putative <i>P. syringae</i> abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>
15/06/2016	19	B	7,62	5,88
15/06/2016	19	C	6,35	4,24
15/06/2016	20	A	7,55	6,06
15/06/2016	20	B	7,88	5,42
15/06/2016	20	C	8,04	5,55

**Table 2.** Bacterial abundances from samples of the three sown ground cover plants, *i.e.* *F. arundinacea*, *L. perenne* and *T. repens*, and mixtures of these plants with *P. vulgaris*.

Sampling Date	Plot	Sample	Species	Total bacterial abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Putative <i>P. syringae</i> abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>
04/07/2016	4	P1	<i>P. vulgaris</i>	7,57	6,89
04/07/2016	4	P2	<i>P. vulgaris</i>	7,89	6,06
04/07/2016	4	L1	<i>L. perenne</i>	8,87	7,77
04/07/2016	4	L2	<i>L. perenne</i>	8,78	7,59
04/07/2016	4	F1	<i>F. arundinacea</i>	7,92	6,60
04/07/2016	4	F2	<i>F. arundinacea</i>	7,18	5,41
04/07/2016	4	T1	<i>T. repens</i>	6,96	5,59
04/07/2016	4	T2	<i>T. repens</i>	6,67	4,87
04/07/2016	4	PL1	<i>P. vulgaris</i> + <i>L. perenne</i>	8,47	7,20
04/07/2016	4	PL2	<i>P. vulgaris</i> + <i>L. perenne</i>	8,70	7,38
04/07/2016	4	PF1	<i>P. vulgaris</i> + <i>F. arundinacea</i>	7,48	6,80
04/07/2016	4	PF2	<i>P. vulgaris</i> + <i>F. arundinacea</i>	7,28	6,01
04/07/2016	4	PT1	<i>P. vulgaris</i> + <i>T. repens</i>	7,91	6,75
04/07/2016	4	PT2	<i>P. vulgaris</i> + <i>T. repens</i>	7,99	6,62
04/07/2016	5	P1	<i>P. vulgaris</i>	7,85	6,37
04/07/2016	5	P2	<i>P. vulgaris</i>	7,56	6,32
04/07/2016	5	L1	<i>L. perenne</i>	8,64	7,30
04/07/2016	5	L2	<i>L. perenne</i>	8,67	7,51
04/07/2016	5	F1	<i>F. arundinacea</i>	7,89	6,23
04/07/2016	5	F2	<i>F. arundinacea</i>	6,06	4,65
04/07/2016	5	T1	<i>T. repens</i>	7,08	5,41
04/07/2016	5	T2	<i>T. repens</i>	6,89	5,45
04/07/2016	5	PL1	<i>P. vulgaris</i> + <i>L. perenne</i>	8,53	6,73
04/07/2016	5	PL2	<i>P. vulgaris</i> + <i>L. perenne</i>	8,43	7,23
04/07/2016	5	PF1	<i>P. vulgaris</i> + <i>F. arundinacea</i>	6,94	5,84
04/07/2016	5	PF2	<i>P. vulgaris</i> + <i>F. arundinacea</i>	7,04	4,77
04/07/2016	5	PT1	<i>P. vulgaris</i> + <i>T. repens</i>	7,12	5,28
04/07/2016	5	PT2	<i>P. vulgaris</i> + <i>T. repens</i>	6,87	5,06
04/07/2016	10	P1	<i>P. vulgaris</i>	7,22	5,82
04/07/2016	10	P2	<i>P. vulgaris</i>	7,35	6,02
04/07/2016	10	L1	<i>L. perenne</i>	8,78	6,80
04/07/2016	10	L2	<i>L. perenne</i>	8,48	6,98
04/07/2016	10	F1	<i>F. arundinacea</i>	7,60	5,99
04/07/2016	10	F2	<i>F. arundinacea</i>	7,81	5,87
04/07/2016	10	T1	<i>T. repens</i>	6,35	5,02



Sampling Date	Plot	Sample	Species	Total bacterial abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>	Putative <i>P. syringae</i> abundance Log <sub>10</sub> CFU g <sup>-1</sup>
04/07/2016	10	T2	<i>T. repens</i>	7,59	5,71
04/07/2016	10	PL1	<i>P. vulgaris</i> + <i>L. perenne</i>	8,21	6,62
04/07/2016	10	PL2	<i>P. vulgaris</i> + <i>L. perenne</i>	8,27	6,62
04/07/2016	10	PF1	<i>P. vulgaris</i> + <i>F. arundinacea</i>	7,03	5,78
04/07/2016	10	PF2	<i>P. vulgaris</i> + <i>F. arundinacea</i>	7,90	6,45
04/07/2016	10	PT1	<i>P. vulgaris</i> + <i>T. repens</i>	6,89	4,33
04/07/2016	10	PT2	<i>P. vulgaris</i> + <i>T. repens</i>	7,36	5,60
04/07/2016	15	P1	<i>P. vulgaris</i>	8,15	6,98
04/07/2016	15	P2	<i>P. vulgaris</i>	7,92	5,92
04/07/2016	15	L1	<i>L. perenne</i>	8,85	7,51
04/07/2016	15	L2	<i>L. perenne</i>	8,55	6,19
04/07/2016	15	F1	<i>F. arundinacea</i>	6,07	4,87
04/07/2016	15	F2	<i>F. arundinacea</i>	7,23	5,71
04/07/2016	15	T1	<i>T. repens</i>	8,12	7,38
04/07/2016	15	T2	<i>T. repens</i>	7,99	6,72
04/07/2016	15	PL1	<i>P. vulgaris</i> + <i>L. perenne</i>	8,66	7,59
04/07/2016	15	PL2	<i>P. vulgaris</i> + <i>L. perenne</i>	8,34	5,85
04/07/2016	15	PF1	<i>P. vulgaris</i> + <i>F. arundinacea</i>	6,91	4,39
04/07/2016	15	PF2	<i>P. vulgaris</i> + <i>F. arundinacea</i>	7,22	5,36
04/07/2016	15	PT1	<i>P. vulgaris</i> + <i>T. repens</i>	6,94	5,58
04/07/2016	15	PT2	<i>P. vulgaris</i> + <i>T. repens</i>	7,50	6,36
04/07/2016	18	P1	<i>P. vulgaris</i>	8,22	6,93
04/07/2016	18	P2	<i>P. vulgaris</i>	8,28	6,50
04/07/2016	18	L1	<i>L. perenne</i>	8,63	7,12
04/07/2016	18	L2	<i>L. perenne</i>	8,23	6,28
04/07/2016	18	F1	<i>F. arundinacea</i>	6,92	4,83
04/07/2016	18	F2	<i>F. arundinacea</i>	5,64	5,46
04/07/2016	18	T1	<i>T. repens</i>	6,50	4,03
04/07/2016	18	T2	<i>T. repens</i>	6,79	4,54
04/07/2016	18	PL1	<i>P. vulgaris</i> + <i>L. perenne</i>	8,63	6,78
04/07/2016	18	PL2	<i>P. vulgaris</i> + <i>L. perenne</i>	8,09	6,27
04/07/2016	18	PF1	<i>P. vulgaris</i> + <i>F. arundinacea</i>	7,48	5,65
04/07/2016	18	PF2	<i>P. vulgaris</i> + <i>F. arundinacea</i>	7,38	6,40
04/07/2016	18	PT1	<i>P. vulgaris</i> + <i>T. repens</i>	7,16	4,80
04/07/2016	18	PT2	<i>P. vulgaris</i> + <i>T. repens</i>	6,80	4,67

**Table 3.** Percent cover of *F. arundinacea*, *L. perenne*, *T. repens*, local *Trifolium*, *P. vulgaris*, other unidentified plant species, litter and bare ground. Percent cover was estimated in three 1 m<sup>2</sup> quadrats in each plot.

Sampling date	Plot	Rep	<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	Local <i>Trifolium</i>	<i>Prunella vulgaris</i>	Other unidentified plant species	Litter	Bare soil
07/04/2016	1	A	8	15	15	5	8	25	0	10
07/04/2016	1	B	10	15	40	5	5	15	0	5
07/04/2016	1	C	8	20	35	2	5	30	0	5
07/04/2016	2	A	10	25	30	2	25	5	0	2
07/04/2016	2	B	15	15	45	5	20	10	0	2

Sampling date	Plot	Rep	<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	Local <i>Trifolium</i>	<i>Prunella vulgaris</i>	Other unidentified plant species	Litter	Bare soil
07/04/2016	2	C	20	20	25	5	15	10	0	15
07/04/2016	3	A	10	10	35	25	0	30	0	2
07/04/2016	3	B	5	20	30	10	0	10	0	5
07/04/2016	3	C	10	20	35	15	0	20	0	10
07/04/2016	4	A	10	20	8	5	25	15	0	15
07/04/2016	4	B	8	15	15	8	25	8	0	8
07/04/2016	4	C	5	15	15	8	25	8	0	15
07/04/2016	5	A	10	35	30	25	35	10	0	5
07/04/2016	5	B	15	30	20	10	45	15	0	10
07/04/2016	5	C	15	25	30	5	45	10	0	5
07/04/2016	6	A	10	30	15	15	8	5	0	10
07/04/2016	6	B	10	25	15	10	8	8	0	15
07/04/2016	6	C	15	15	35	10	8	5	0	15
07/04/2016	7	A	10	15	5	20	15	15	0	15
07/04/2016	7	B	10	15	15	8	10	20	0	8
07/04/2016	7	C	10	20	15	8	10	25	0	15
07/04/2016	8	A	5	15	35	8	0	8	0	2
07/04/2016	8	B	8	15	15	8	0	50	0	5
07/04/2016	8	C	5	20	8	5	0	8	0	15
07/04/2016	9	A	20	20	15	35	0	5	0	5
07/04/2016	9	B	20	30	10	30	0	15	0	5
07/04/2016	9	C	15	25	15	30	0	10	0	10
07/04/2016	10	A	5	25	2	25	25	5	0	5
07/04/2016	10	B	5	35	5	35	25	2	0	2
07/04/2016	10	C	5	35	8	35	25	2	0	2
07/04/2016	11	A	10	15	5	25	5	5	0	5
07/04/2016	11	B	5	5	10	60	2	5	0	0
07/04/2016	11	C	5	5	25	25	5	5	0	2
07/04/2016	12	A	8	15	3	25	15	8	0	25
07/04/2016	12	B	8	20	2	30	10	5	0	0
07/04/2016	12	C	5	15	5	60	8	3	0	0
07/04/2016	13	A	20	35	10	10	15	5	0	30
07/04/2016	13	B	20	35	5	10	15	5	0	30
07/04/2016	13	C	15	20	15	5	20	10	0	10
07/04/2016	14	A	5	10	5	40	0	2	0	5
07/04/2016	14	B	5	10	8	40	0	2	0	5
07/04/2016	14	C	5	15	5	25	0	5	0	8
07/04/2016	15	A	5	15	5	25	15	5	0	5
07/04/2016	15	B	5	10	5	50	15	5	0	2
07/04/2016	15	C	5	25	5	25	20	5	0	5
07/04/2016	16	A	5	10	2	35	5	2	0	2
07/04/2016	16	B	8	15	3	25	3	5	0	15
07/04/2016	16	C	8	15	2	35	3	5	0	5
07/04/2016	17	A	10	20	5	10	5	15	0	20
07/04/2016	17	B	15	40	15	30	10	15	0	3
07/04/2016	17	C	10	20	3	15	5	15	0	35
07/04/2016	18	A	5	10	8	35	30	2	0	15
07/04/2016	18	B	5	25	5	25	20	10	0	15
07/04/2016	18	C	5	15	2	20	25	5	0	30
07/04/2016	19	A	5	15	2	10	15	5	0	5
07/04/2016	19	B	5	35	2	5	15	5	0	10
07/04/2016	19	C	5	15	2	10	8	5	0	10
07/04/2016	20	A	10	15	10	15	0	5	0	30
07/04/2016	20	B	5	15	5	35	0	5	0	10
07/04/2016	20	C	2	15	5	20	0	5	0	15

Sampling date	Plot	Rep	<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	Local <i>Trifolium</i>	<i>Prunella vulgaris</i>	Other unidentified plant species	Litter	Bare soil
15/06/2016	1	A	8	32	24	0	8	1	4	4
15/06/2016	1	B	16	32	22	0	6	1	4	4
15/06/2016	1	C	2	32	28	0	6	6	10	6
15/06/2016	2	A	28	40	52	0	32	2	2	1
15/06/2016	2	B	8	24	80	0	32	2	2	2
15/06/2016	2	C	20	24	52	0	16	2	6	2
15/06/2016	3	A	10	5	85	0	0	1	0	0
15/06/2016	3	B	6	8	85	0	0	3	0	0
15/06/2016	3	C	5	14	50	0	0	8	2	1
15/06/2016	4	A	16	16	50	0	25	4	2	0
15/06/2016	4	B	12	8	70	0	20	6	2	0
15/06/2016	4	C	16	16	60	1	22	3	2	0
15/06/2016	5	A	24	32	32	0	40	2	2	1
15/06/2016	5	B	24	20	56	0	36	4	1	1
15/06/2016	5	C	12	24	36	0	56	1	2	2
15/06/2016	6	A	24	28	64	0	12	2	0	0
15/06/2016	6	B	24	18	32	0	12	12	0	0
15/06/2016	6	C	28	14	56	0	12	1	2	0
15/06/2016	7	A	20	20	44	0	28	3	1	0
15/06/2016	7	B	24	16	60	0	10	4	0	0
15/06/2016	7	C	8	10	76	0	16	2	2	4
15/06/2016	8	A	16	30	40	0	0	4	12	0
15/06/2016	8	B	12	8	65	0	0	1	2	2
15/06/2016	8	C	8	4	70	0	0	4	2	0
15/06/2016	9	A	32	46	40	0	0	4	2	2
15/06/2016	9	B	20	32	40	0	0	8	4	2
15/06/2016	9	C	24	24	48	0	0	6	3	2
15/06/2016	10	A	20	24	28	1	40	0	2	2
15/06/2016	10	B	20	35	32	0	40	3	2	2
15/06/2016	10	C	16	20	40	0	32	0	2	1
15/06/2016	11	A	12	40	40	2	8	4	3	0
15/06/2016	11	B	12	48	48	4	4	4	1	0
15/06/2016	11	C	16	20	60	1	6	2	1	0
15/06/2016	12	A	20	24	16	3	20	4	8	2
15/06/2016	12	B	24	24	20	4	12	6	10	8
15/06/2016	12	C	20	16	44	2	16	2	8	0
15/06/2016	13	A	20	45	28	1	20	3	0	6
15/06/2016	13	B	20	60	60	0	16	1	2	3
15/06/2016	13	C	20	32	60	1	20	2	0	2
15/06/2016	14	A	16	40	32	0	2	1	2	2
15/06/2016	14	B	24	24	44	0	0	2	2	2
15/06/2016	14	C	40	16	56	0	0	2	14	0
15/06/2016	15	A	20	35	40	2	24	2	8	1
15/06/2016	15	B	12	25	36	2	22	2	6	2
15/06/2016	15	C	25	50	40	4	20	2	3	0
15/06/2016	16	A	20	24	12	2	5	2	4	4
15/06/2016	16	B	20	16	20	2	6	4	16	0
15/06/2016	16	C	16	20	36	2	4	4	12	0
15/06/2016	17	A	25	50	20	0	8	4	15	16
15/06/2016	17	B	20	36	24	0	12	2	20	20
15/06/2016	17	C	16	28	20	2	8	2	10	16
15/06/2016	18	A	8	30	16	1	32	2	16	4
15/06/2016	18	B	8	35	20	1	24	1	16	2
15/06/2016	18	C	6	35	36	1	24	2	16	4
15/06/2016	19	A	16	36	32	1	16	2	8	4

Sampling date	Plot	Rep	<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	Local <i>Trifolium</i>	<i>Prunella vulgaris</i>	Other unidentified plant species	Litter	Bare soil
15/06/2016	19	B	12	40	20	2	18	2	8	6
15/06/2016	19	C	24	30	40	1	24	8	18	4
15/06/2016	20	A	8	20	10	2	0	16	32	10
15/06/2016	20	B	8	40	8	2	0	20	56	8
15/06/2016	20	C	12	40	16	4	0	12	48	8

**Table 4.** Results of immigrating bacterial cell counts carried out on 18 April and 24 June 2016 from 11 am to 7 pm in the five 0 and 30 % plots, results are expressed as  $\text{Log}_{10}$  immigrating bacterial cells  $\text{ha}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Two replicates, called A and B, were renewed each hour in order to avoid desiccation. Total immigrating bacterial cell counts (TSA) were only done on 24 June 2016.

Sampling date	Plot	Sampling time	Rep	$\text{Log}_{10}$ total immigrating bacterial cells $\text{ha}^{-1} \text{h}^{-1}$	$\text{Log}_{10}$ putative <i>P. syringae</i> immigrating bacterial cells $\text{ha}^{-1} \text{h}^{-1}$
18/04/2016	3	11	A	na	0,00
18/04/2016	3	11	B	na	6,92
18/04/2016	3	12	A	na	6,22
18/04/2016	3	12	B	na	0,00
18/04/2016	3	13	A	na	0,00
18/04/2016	3	13	B	na	6,22
18/04/2016	3	14	A	na	0,00
18/04/2016	3	14	B	na	0,00
18/04/2016	3	15	A	na	6,22
18/04/2016	3	15	B	na	6,22
18/04/2016	3	16	A	na	0,00
18/04/2016	3	16	B	na	0,00
18/04/2016	3	17	A	na	6,22
18/04/2016	3	17	B	na	0,00
18/04/2016	3	18	A	na	0,00
18/04/2016	3	18	B	na	6,52
18/04/2016	4	11	A	na	6,22
18/04/2016	4	11	B	na	6,22
18/04/2016	4	12	A	na	6,69
18/04/2016	4	12	B	na	0,00
18/04/2016	4	13	A	na	0,00
18/04/2016	4	13	B	na	6,52
18/04/2016	4	14	A	na	0,00
18/04/2016	4	14	B	na	0,00
18/04/2016	4	15	A	na	0,00
18/04/2016	4	15	B	na	0,00
18/04/2016	4	16	A	na	0,00
18/04/2016	4	16	B	na	0,00
18/04/2016	4	17	A	na	0,00
18/04/2016	4	17	B	na	0,00
18/04/2016	4	18	A	na	6,52
18/04/2016	4	18	B	na	6,22
18/04/2016	5	11	A	na	6,22
18/04/2016	5	11	B	na	6,22
18/04/2016	5	12	A	na	0,00

Sampling date	Plot	Sampling time	Rep	Log <sub>10</sub> total immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> putative <i>P. syringae</i> immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
18/04/2016	5	12	B	na	0,00
18/04/2016	5	13	A	na	0,00
18/04/2016	5	13	B	na	0,00
18/04/2016	5	14	A	na	0,00
18/04/2016	5	14	B	na	6,52
18/04/2016	5	15	A	na	0,00
18/04/2016	5	15	B	na	0,00
18/04/2016	5	16	A	na	0,00
18/04/2016	5	16	B	na	0,00
18/04/2016	5	17	A	na	6,22
18/04/2016	5	17	B	na	6,22
18/04/2016	5	18	A	na	0,00
18/04/2016	5	18	B	na	0,00
18/04/2016	8	11	A	na	0,00
18/04/2016	8	11	B	na	0,00
18/04/2016	8	12	A	na	0,00
18/04/2016	8	12	B	na	0,00
18/04/2016	8	13	A	na	6,22
18/04/2016	8	13	B	na	0,00
18/04/2016	8	14	A	na	6,22
18/04/2016	8	14	B	na	0,00
18/04/2016	8	15	A	na	0,00
18/04/2016	8	15	B	na	0,00
18/04/2016	8	16	A	na	0,00
18/04/2016	8	16	B	na	0,00
18/04/2016	8	17	A	na	0,00
18/04/2016	8	17	B	na	0,00
18/04/2016	8	18	A	na	6,22
18/04/2016	8	18	B	na	0,00
18/04/2016	9	11	A	na	0,00
18/04/2016	9	11	B	na	0,00
18/04/2016	9	12	A	na	0,00
18/04/2016	9	12	B	na	0,00
18/04/2016	9	13	A	na	0,00
18/04/2016	9	13	B	na	0,00
18/04/2016	9	14	A	na	0,00
18/04/2016	9	14	B	na	0,00
18/04/2016	9	15	A	na	0,00
18/04/2016	9	15	B	na	7,17
18/04/2016	9	16	A	na	0,00
18/04/2016	9	16	B	na	0,00
18/04/2016	9	17	A	na	0,00
18/04/2016	9	17	B	na	0,00
18/04/2016	9	18	A	na	0,00
18/04/2016	9	18	B	na	6,22
18/04/2016	10	11	A	na	0,00
18/04/2016	10	11	B	na	0,00
18/04/2016	10	12	A	na	0,00
18/04/2016	10	12	B	na	0,00
18/04/2016	10	13	A	na	6,22
18/04/2016	10	13	B	na	0,00
18/04/2016	10	14	A	na	0,00
18/04/2016	10	14	B	na	0,00
18/04/2016	10	15	A	na	0,00
18/04/2016	10	15	B	na	0,00
18/04/2016	10	16	A	na	0,00

Sampling date	Plot	Sampling time	Rep	Log <sub>10</sub> total immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> putative <i>P. syringae</i> immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
18/04/2016	10	16	B	na	0,00
18/04/2016	10	17	A	na	0,00
18/04/2016	10	17	B	na	0,00
18/04/2016	10	18	A	na	0,00
18/04/2016	10	18	B	na	6,22
18/04/2016	14	11	A	na	0,00
18/04/2016	14	11	B	na	0,00
18/04/2016	14	12	A	na	6,22
18/04/2016	14	12	B	na	0,00
18/04/2016	14	13	A	na	0,00
18/04/2016	14	13	B	na	0,00
18/04/2016	14	14	A	na	0,00
18/04/2016	14	14	B	na	0,00
18/04/2016	14	15	A	na	6,69
18/04/2016	14	15	B	na	0,00
18/04/2016	14	16	A	na	0,00
18/04/2016	14	16	B	na	0,00
18/04/2016	14	17	A	na	0,00
18/04/2016	14	17	B	na	0,00
18/04/2016	14	18	A	na	6,69
18/04/2016	14	18	B	na	0,00
18/04/2016	15	11	A	na	0,00
18/04/2016	15	11	B	na	0,00
18/04/2016	15	12	A	na	0,00
18/04/2016	15	12	B	na	0,00
18/04/2016	15	13	A	na	0,00
18/04/2016	15	13	B	na	0,00
18/04/2016	15	14	A	na	0,00
18/04/2016	15	14	B	na	0,00
18/04/2016	15	15	A	na	0,00
18/04/2016	15	15	B	na	0,00
18/04/2016	15	16	A	na	0,00
18/04/2016	15	16	B	na	0,00
18/04/2016	15	17	A	na	6,22
18/04/2016	15	17	B	na	0,00
18/04/2016	15	18	A	na	6,22
18/04/2016	15	18	B	na	0,00
18/04/2016	18	11	A	na	0,00
18/04/2016	18	11	B	na	0,00
18/04/2016	18	12	A	na	0,00
18/04/2016	18	12	B	na	0,00
18/04/2016	18	13	A	na	0,00
18/04/2016	18	13	B	na	6,52
18/04/2016	18	14	A	na	0,00
18/04/2016	18	14	B	na	0,00
18/04/2016	18	15	A	na	0,00
18/04/2016	18	15	B	na	0,00
18/04/2016	18	16	A	na	0,00
18/04/2016	18	16	B	na	0,00
18/04/2016	18	17	A	na	0,00
18/04/2016	18	17	B	na	0,00
18/04/2016	18	18	A	na	6,22
18/04/2016	18	18	B	na	6,52
18/04/2016	20	11	A	na	0,00
18/04/2016	20	11	B	na	0,00
18/04/2016	20	12	A	na	0,00

Sampling date	Plot	Sampling time	Rep	Log <sub>10</sub> total immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> putative <i>P. syringae</i> immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
18/04/2016	20	12	B	na	6,22
18/04/2016	20	13	A	na	0,00
18/04/2016	20	13	B	na	0,00
18/04/2016	20	14	A	na	0,00
18/04/2016	20	14	B	na	0,00
18/04/2016	20	15	A	na	0,00
18/04/2016	20	15	B	na	0,00
18/04/2016	20	16	A	na	0,00
18/04/2016	20	16	B	na	0,00
18/04/2016	20	17	A	na	0,00
18/04/2016	20	17	B	na	0,00
18/04/2016	20	18	A	na	0,00
18/04/2016	20	18	B	na	0,00
24/06/2016	3	11	A	8,14	7,06
24/06/2016	3	11	B	7,96	6,22
24/06/2016	3	12	A	7,96	6,22
24/06/2016	3	12	B	7,92	6,52
24/06/2016	3	13	A	8,01	6,69
24/06/2016	3	13	B	8,12	6,22
24/06/2016	3	14	A	8,11	0,00
24/06/2016	3	14	B	8,18	0,00
24/06/2016	3	15	A	8,19	6,69
24/06/2016	3	15	B	8,05	6,69
24/06/2016	3	16	A	8,15	6,22
24/06/2016	3	16	B	8,06	6,82
24/06/2016	3	17	A	8,63	7,06
24/06/2016	3	17	B	8,51	7,06
24/06/2016	3	18	A	7,96	0,00
24/06/2016	3	18	B	7,99	6,92
24/06/2016	4	11	A	8,15	6,99
24/06/2016	4	11	B	7,65	6,22
24/06/2016	4	12	A	8,02	0,00
24/06/2016	4	12	B	7,86	6,22
24/06/2016	4	13	A	7,47	0,00
24/06/2016	4	13	B	7,90	6,22
24/06/2016	4	14	A	7,91	6,22
24/06/2016	4	14	B	8,06	6,22
24/06/2016	4	15	A	7,92	6,82
24/06/2016	4	15	B	8,01	6,52
24/06/2016	4	16	A	7,98	6,22
24/06/2016	4	16	B	7,94	6,69
24/06/2016	4	17	A	8,32	6,92
24/06/2016	4	17	B	8,26	7,12
24/06/2016	4	18	A	8,02	6,52
24/06/2016	4	18	B	7,98	6,22
24/06/2016	5	11	A	8,16	6,92
24/06/2016	5	11	B	8,14	0,00
24/06/2016	5	12	A	8,56	7,26
24/06/2016	5	12	B	8,54	7,56
24/06/2016	5	13	A	7,69	6,92
24/06/2016	5	13	B	8,02	6,22
24/06/2016	5	14	A	8,57	7,06
24/06/2016	5	14	B	8,45	7,30
24/06/2016	5	15	A	8,33	6,92
24/06/2016	5	15	B	8,39	6,82
24/06/2016	5	16	A	8,07	7,17

Sampling date	Plot	Sampling time	Rep	Log <sub>10</sub> total immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> putative <i>P. syringae</i> immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
24/06/2016	5	16	B	7,92	6,22
24/06/2016	5	17	A	8,16	6,69
24/06/2016	5	17	B	8,43	6,22
24/06/2016	5	18	A	8,27	6,82
24/06/2016	5	18	B	8,11	6,82
24/06/2016	8	11	A	7,75	6,22
24/06/2016	8	11	B	7,80	6,22
24/06/2016	8	12	A	7,93	6,52
24/06/2016	8	12	B	7,97	6,52
24/06/2016	8	13	A	7,33	0,00
24/06/2016	8	13	B	7,52	0,00
24/06/2016	8	14	A	8,92	6,22
24/06/2016	8	14	B	7,82	6,22
24/06/2016	8	15	A	7,91	0,00
24/06/2016	8	15	B	8,22	6,52
24/06/2016	8	16	A	8,28	6,69
24/06/2016	8	16	B	7,98	6,69
24/06/2016	8	17	A	8,47	7,17
24/06/2016	8	17	B	8,35	7,42
24/06/2016	8	18	A	7,95	6,22
24/06/2016	8	18	B	7,99	0,00
24/06/2016	9	11	A	8,23	6,69
24/06/2016	9	11	B	8,49	6,82
24/06/2016	9	12	A	8,55	7,30
24/06/2016	9	12	B	8,49	7,22
24/06/2016	9	13	A	7,95	0,00
24/06/2016	9	13	B	7,69	6,52
24/06/2016	9	14	A	8,20	6,52
24/06/2016	9	14	B	8,09	6,52
24/06/2016	9	15	A	8,32	6,82
24/06/2016	9	15	B	8,15	6,92
24/06/2016	9	16	A	8,15	6,22
24/06/2016	9	16	B	8,59	6,82
24/06/2016	9	17	A	8,22	6,22
24/06/2016	9	17	B	8,05	6,92
24/06/2016	9	18	A	8,42	6,92
24/06/2016	9	18	B	8,30	6,92
24/06/2016	10	11	A	8,28	6,22
24/06/2016	10	11	B	8,04	0,00
24/06/2016	10	12	A	8,08	7,12
24/06/2016	10	12	B	8,11	6,69
24/06/2016	10	13	A	7,76	0,00
24/06/2016	10	13	B	7,63	0,00
24/06/2016	10	14	A	8,59	7,12
24/06/2016	10	14	B	8,44	6,52
24/06/2016	10	15	A	8,15	6,69
24/06/2016	10	15	B	8,41	6,22
24/06/2016	10	16	A	8,30	6,22
24/06/2016	10	16	B	8,35	6,52
24/06/2016	10	17	A	8,04	0,00
24/06/2016	10	17	B	7,94	6,22
24/06/2016	10	18	A	8,25	6,82
24/06/2016	10	18	B	8,20	6,92
24/06/2016	14	11	A	8,33	6,69
24/06/2016	14	11	B	8,41	7,17
24/06/2016	14	12	A	8,05	0,00



Sampling date	Plot	Sampling time	Rep	Log <sub>10</sub> total immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> putative <i>P. syringae</i> immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
24/06/2016	14	12	B	8,04	6,22
24/06/2016	14	13	A	8,21	6,92
24/06/2016	14	13	B	8,04	6,82
24/06/2016	14	14	A	8,57	6,92
24/06/2016	14	14	B	8,56	6,82
24/06/2016	14	15	A	8,68	7,47
24/06/2016	14	15	B	8,66	6,69
24/06/2016	14	16	A	8,32	6,92
24/06/2016	14	16	B	8,29	0,00
24/06/2016	14	17	A	8,25	6,52
24/06/2016	14	17	B	8,34	6,99
24/06/2016	14	18	A	8,32	6,69
24/06/2016	14	18	B	8,38	6,22
24/06/2016	15	11	A	7,90	0,00
24/06/2016	15	11	B	7,81	6,22
24/06/2016	15	12	A	8,10	6,22
24/06/2016	15	12	B	8,15	6,22
24/06/2016	15	13	A	7,54	6,22
24/06/2016	15	13	B	7,76	6,22
24/06/2016	15	14	A	8,15	6,82
24/06/2016	15	14	B	8,25	6,22
24/06/2016	15	15	A	8,41	6,22
24/06/2016	15	15	B	8,48	6,69
24/06/2016	15	16	A	8,28	6,99
24/06/2016	15	16	B	8,70	7,22
24/06/2016	15	17	A	8,18	0,00
24/06/2016	15	17	B	8,41	6,52
24/06/2016	15	18	A	8,32	6,52
24/06/2016	15	18	B	8,40	6,52
24/06/2016	18	11	A	8,24	6,99
24/06/2016	18	11	B	8,49	6,92
24/06/2016	18	12	A	8,10	6,22
24/06/2016	18	12	B	8,09	0,00
24/06/2016	18	13	A	7,85	0,00
24/06/2016	18	13	B	7,66	0,00
24/06/2016	18	14	A	8,34	6,22
24/06/2016	18	14	B	7,90	6,52
24/06/2016	18	15	A	8,71	7,12
24/06/2016	18	15	B	8,51	6,92
24/06/2016	18	16	A	8,44	6,69
24/06/2016	18	16	B	8,21	6,69
24/06/2016	18	17	A	8,30	0,00
24/06/2016	18	17	B	8,26	6,52
24/06/2016	18	18	A	8,22	6,52
24/06/2016	18	18	B	8,41	6,92
24/06/2016	20	11	A	7,73	6,69
24/06/2016	20	11	B	7,76	6,69
24/06/2016	20	12	A	8,12	6,99
24/06/2016	20	12	B	8,35	6,22
24/06/2016	20	13	A	8,04	6,69
24/06/2016	20	13	B	7,58	0,00
24/06/2016	20	14	A	7,49	6,22
24/06/2016	20	14	B	7,90	6,69
24/06/2016	20	15	A	7,88	6,52
24/06/2016	20	15	B	7,73	6,22
24/06/2016	20	16	A	8,32	6,69

Sampling date	Plot	Sampling time	Rep	Log <sub>10</sub> total immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Log <sub>10</sub> putative <i>P. syringae</i> immigrating bacterial cells ha <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
24/06/2016	20	16	B	8,10	7,36
24/06/2016	20	17	A	8,11	0,00
24/06/2016	20	17	B	8,14	6,22
24/06/2016	20	18	A	8,40	6,69
24/06/2016	20	18	B	8,50	6,22

## Supplementary Data

Experimental field setup: remnant weed removal by plowing and irrigating the soil during autumn 2015 (**Pictures 1 and 2**), seed germination rate tests conducted in greenhouse for the four species used during this experiment, *i.e.* *F. arundinacea*, *L. perenne*, *T. repens* and *P. vulgaris* (**Picture 3**), *P. vulgaris* sowed in the 5, 15 and 30 % plots (**Pictures 4, 5 and 6**), *P. vulgaris* plants growing in greenhouse during winter 2015 (**Pictures 7 and 8**), and experimental field in spring 2016 before and after plot mowing (**Pictures 9 and 10**).

**Picture 1.**



Picture 2.



Picture 3.



Picture 4.



Picture 5.



Picture 6.



Picture 7.



Picture 8.



Picture 9.



Picture 10.



## Synthèse des travaux de recherche et perspectives

---



Depuis plus d'une vingtaine d'années, la prise de conscience de l'impact des activités humaines sur l'environnement a profondément modifié la perception de ce dernier par la société. L'intensification de l'agriculture a mené à la mise en place de systèmes monoculturaux et à l'utilisation massive d'intrants chimiques, tels que les pesticides, herbicides et fertilisants, aboutissant à la réduction de la biodiversité au sein des cultures. La réduction de la biodiversité favorise l'émergence de maladies, la propagation de celles-ci, et rend les cultures plus sensibles à l'attaque et l'envahissement par des espèces nuisibles. Ces phénomènes sont le résultat de la proximité et densité des individus hôtes cultivés, favorisant le contact, le transfert et le maintien d'importantes populations de microorganismes pathogènes, ainsi que la destruction des habitats et ressources des prédateurs et/ou parasitoïdes naturels des espèces nuisibles. Dans le cas des vergers, systèmes culturaux pérennes, les populations de microorganismes pathogènes et celles d'espèces nuisibles peuvent atteindre des tailles très importantes et le seul moyen de lutte en agriculture conventionnelle est l'utilisation d'importantes quantités de pesticides. De ce fait, les systèmes culturaux pérennes sont ceux qui subissent le plus de traitements chimiques, on peut citer l'exemple des vergers de pommiers et leurs 36 applications annuelles de pesticides en moyenne au niveau français. Dans le cadre de la prise de conscience de la nécessité de la préservation de l'environnement, une part croissante de consommateurs recherche des produits impliquant une agriculture plus responsable. De ce fait, de nombreux producteurs s'orientent vers des procédés agricoles durables et cherchent à minimiser l'utilisation d'intrants chimiques afin d'augmenter la valeur commerciale de leurs produits. Dans le contexte du développement de l'agroécologie, l'utilisation de l'ingénierie écologique, c'est-à-dire la mise au point d'écosystèmes bénéfiques à la fois à la société humaine et à l'environnement, a fait ses preuves dans divers systèmes

cultureaux (Simon *et al.*, 2010 ; Prokopy, 1994 ; Bugg and Waddington, 1994 ; Wan *et al.*, 2014 ; Hammermeister, 2016 ; Guerra and Steenwerth, 2012).

Dans les systèmes pérennes, l'augmentation de la biodiversité peut être obtenue en manipulant la composition des communautés végétales des couvre-sols. Cela permet de recréer les habitats et les ressources nécessaires au retour des prédateurs naturels de nombreuses espèces nuisibles, comme par exemple les arthropodes herbivores. En revanche la lutte contre les microorganismes pathogènes repose sur l'utilisation de fongicides et bactéricides. En France il s'agit essentiellement de traitements cupriques dont l'efficacité est variable et n'endigée pas totalement la propagation de certaines maladies émergentes, comme par exemple le chancre bactérien du kiwi causé par *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa). L'utilisation de procédés d'ingénierie écologique pourrait être une solution alternative et durable afin de réduire les populations de microorganismes phytopathogènes. Les couvre-sols végétaux et plantes adventices des vergers hébergent des communautés de microorganismes pathogènes responsables des maladies des arbres fruitiers. Cependant, l'influence de la composition et de la gestion des communautés végétales sur l'émergence de maladies des cultures reste méconnue.

Son implication dans l'émergence de maladies sur plus d'une vingtaine d'espèces ligneuses depuis le début du XXI<sup>ème</sup> siècle, ainsi que son ubiquité dans les différents compartiments environnementaux, font que *P. syringae* représente un excellent modèle d'étude pour améliorer la compréhension des facteurs impliqués dans l'émergence des maladies des végétaux. Ainsi, les travaux de recherche menés ces trois dernières années dans le cadre de ma thèse ont focalisé sur l'approfondissement des connaissances concernant les effets de la composition et de la gestion des communautés végétales des couvre-sols sur les populations de *P. syringae* qui y sont associées, ainsi que celles des arbres fruitiers.

## **I. Mise au point de marqueurs moléculaires innovants pour l'identification et l'affiliation phylogénétique au sein du complexe *P. syringae***

Dans le cadre des travaux de recherche effectués avant cette thèse, l'identification de *P. syringae* reposait sur des critères morphologiques et phénotypiques (Morris *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2010; Monteil *et al.*, 2012; Monteil *et al.*, 2013a,b; Monteil *et al.*, 2014), et l'affiliation phylogénétique était réalisée par séquençage d'un ou plusieurs gènes de ménage tel que décrit par Berge *et al.* (2014).

Compte tenu des connaissances actuelles, ces techniques sont partiellement remises en question en raison de la très grande variabilité génétique et phénotypique présente au sein du complexe *P. syringae*. Ces techniques sont mal adaptées à des échantillons de grande taille, car elles impliquent la culture des bactéries sur différents milieux, ainsi qu'une à plusieurs étapes de purification des souches précédant l'amplification PCR des gènes destinés au séquençage. De plus, certains critères de discrimination morphologique et/ou phénotypique peuvent conduire à des choix différentiels selon l'opérateur réalisant l'identification. La mise au point de la paire d'amorces moléculaires permettant l'identification spécifique de *P. syringae* par PCR a permis l'accélération du processus d'identification des souches de *P. syringae* (Guilbaud *et al.*, 2016). Ainsi lors du traitement d'échantillons environnementaux il devient possible de passer outre les étapes de discrimination morphologique et phénotypique. L'identification par PCR permet de cribler un très grand nombre de souches putatives *P. syringae* en très peu de temps. Cependant, l'affiliation phylogénétique des souches passe tout de même par la purification de celles-ci et le séquençage d'un ou plusieurs gènes de ménage. Malgré cette avancée technique, la caractérisation de communautés entières de *P. syringae* constituées de plusieurs centaines à plusieurs milliers de souches

issues d'échantillons environnementaux reste très chronophage et engendre des coûts importants (purification, amplification, séquençage). Ainsi dans l'optique de caractériser des populations entières de *P. syringae* associées aux plantes couvre-sol et arbres fruitiers, le premier objectif a été la mise au point d'une technique permettant à la fois d'identifier de façon spécifique les bactéries appartenant au complexe *P. syringae*, ainsi que déterminer leur affiliation à l'une des lignées génétiques parmi celles les plus fréquemment rencontrées dans les échantillons environnementaux.

### **I.1. Affiliation phylogénétique spécifique à 9 des 13 phylogroupes actuels de *P. syringae* par PCR multiplex**

L'analyse de 54 génomes de *P. syringae* a permis d'identifier 7 gènes candidats pour la mise au point de marqueurs pour les phylogroupes 1, 2, 3, 4, 9, 10 et 13. La spécificité et la sensibilité de ces marqueurs, en partie développées en se basant sur le polymorphisme nucléotidique des séquences, ont été validés sur plus de 200 souches de *P. syringae* représentatives de la variabilité génétique du complexe. A ceux-ci s'ajoutent les marqueurs spécifiques des phylogroupes 7 et 8, renfermant des souches de *P. syringae* et *P. viridiflava* très proches génétiquement, mis au point précédemment (Bartoli *et al.*, 2014). Afin d'améliorer les rendements d'affiliation, les marqueurs phylogénétiques ont été combinés, dans la mesure du possible compte tenu de la taille des produits d'amplifications, au marqueur spécifique de *P. syringae*. Ainsi actuellement il est possible grâce à 2 PCR multiplex et 2 PCR simplex d'identifier jusqu'à 9 des 13 phylogroupes décrits par Berge *et al.* (2014). Les phylogroupes non ciblés avec cette méthode, c'est-à-dire les phylogroupes 5, 6, 11 et 12,

représentent généralement une fraction minoritaire des populations de *P. syringae* issues d'échantillons environnementaux.

Cette technique a permis de passer outre les étapes d'identification basées sur des critères morphologiques et phénotypiques, très souvent interprétés de façon différentielle selon l'opérateur en charge de la tâche, et de cribler directement soit l'ensemble, soit une fraction représentative des souches putatives de *P. syringae* isolées à partir d'un échantillon. Désormais nous déployons le séquençage principalement pour les souches pour lesquelles l'affiliation phylogénétique n'a pas pu être établie par PCR.

## **I.2. Perspectives d'évolution des techniques de caractérisation des populations de *P. syringae***

Avec le nombre croissant de génomes de *P. syringae* disponibles sur les bases de données publiques il serait possible d'affiner l'affiliation génétique aux différents sous-groupes présents au sein des 13 phylogroupes. L'adaptation de ces marqueurs à la qPCR permettrait d'envisager des quantifications très précises des différentes lignées génétiques présentes dans un échantillon sans avoir à cultiver les bactéries. Enfin, actuellement les membres de mon équipe d'accueil, ainsi que plusieurs chercheurs de l'université des sciences appliquées de Zurich (ZHAW), travaillent sur l'adaptation de ces marqueurs à la technique d'amplification génique appelée LAMP pour « loop-mediated isothermal amplification », ou technique d'amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle (Notomi *et al.*, 2000; Ruinelli *et al.*, 2016). Cette technique LAMP est une alternative à la PCR classique qui permet d'amplifier la séquence d'ADN cible avec une haute sensibilité et spécificité, le tout dans des conditions

isothermes et en une heure environ, et qui ne nécessite ni matériel ni personnel spécifique (Parida *et al.*, 2008).

### **I.3. Identification de nouveaux réservoirs pour les phylogroupes 10 et 13**

Lors de l'étape de validation des marqueurs, menée sur un ensemble de souches putatives *P. syringae* isolées en vergers d'abricotiers et de kiwis, ceux-ci ont permis de détecter pour la première fois la présence de *P. syringae* appartenant aux phylogroupes 10 et 13 sur des plantes couvre-sol, ainsi que des plants d'abricotiers et de kiwis. Auparavant, ces phylogroupes avaient été isolés à de nombreuses reprises en dehors de systèmes agricoles à partir de substrats non végétaux (Berge *et al.*, 2014). La découverte de ces phylogroupes sur des plantes couvre-sol, des abricotiers et des kiwis amène des questions concernant leur rôle et leur potentielle implication dans l'émergence de maladies. Elle soulève aussi des questions sur les adaptations des souches de ces phylogroupes qui favorisent leur survie dans les habitats non agricoles et aquatiques par rapport aux habitats agricoles.

## **II. Révélation de la diversité des populations de *P. syringae* associées aux vergers**

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse sont les premiers à caractériser la structure génétique des populations de *P. syringae* associées aux plantes couvre-sol et arbres fruitiers. On sait que les plantes couvre-sol et adventices des vergers, et autres cultures, hébergent de nombreux microorganismes pathogènes dont *P. syringae* (Wisler and Norris, 2005). Cependant, le rôle exact de ces plantes dans l'émergence des maladies reste incompris.

Jusqu'à présent, les études consistent essentiellement en l'isolement et l'identification des souches connues pour leur pouvoir pathogène, en ignorant le reste de la communauté bactérienne. Cette recherche ciblée de souches pathogènes vient du concept « un microbe, une maladie », et ne tient absolument pas compte des autres microorganismes présents pouvant potentiellement également être impliqués dans le développement de la maladie. Actuellement le terme de pathobiome commence à être de plus en plus utilisé et accepté par la communauté scientifique. La notion de pathobiome suppose que l'expression de la maladie chez un hôte peut être le résultat d'interactions complexes entre plusieurs microorganismes d'une même espèce, ou d'espèces différentes, qui se complètent par la sécrétion d'enzymes, de molécules diverses, de facteurs de croissance et/ou de virulence requis pour induire la maladie (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014). Les études démontrant de telles interactions sont peu nombreuses et concernent généralement des interactions entre microorganismes appartenant à la même espèce. On peut citer par exemple le cas de *X. campestris* pv. *campestris* et de *P. syringae* pv. *syringae*, dont la croissance réduite des mutants *hrp* dans l'hôte peut être rétablie par la co-inoculation avec les souches sauvages non mutantes (Kamoun and Kado, 1990; Hirano *et al.*, 1999). Un effet inverse peut également être observé, c'est-à-dire que la présence simultanée de plusieurs souches peut conduire à une réduction de la fitness de l'une d'entre elles. C'est le cas de Psa biovar 3, souche épidémique responsable du chancre bactérien du kiwi, lorsqu'elle est co-inoculée avec des souches de *P. syringae* appartenant à la même lignée génétique (Bartoli *et al.*, 2015).

Ici, l'étude des populations de *P. syringae* associées aux vergers d'abricotiers et de kiwis a permis de mettre en évidence la grande diversité de celles-ci. Les couvre-sols hébergent des populations abondantes de l'ordre de  $10^4$  à  $10^7$  *P. syringae* par gramme de matière fraîche tout au long de l'année, n'excédant en revanche jamais plus de 30 % de la communauté

bactérienne totale. Dans le cas des arbres fruitiers des différences notables ont été observées. Chez le kiwi, des *P. syringae* épiphytes ont pu être isolés à partir des bourgeons des quatre vergers. Cependant, des *P. syringae* endophytes n'ont été isolés qu'à partir d'échantillons de vignes de kiwi du verger K4 fortement atteint par la maladie. Chez l'abricotier la présence de *P. syringae* est plus irrégulière. Dans le cas de deux vergers d'abricotiers (P1 et P2), présentant de nombreux symptômes et un fort taux de mortalité, des *P. syringae* épi- et endophytes n'ont pu être isolés qu'à partir de quelques-uns des arbres échantillonnés. En revanche, la quasi-totalité des arbres du troisième verger d'abricotiers étudié (P3) hébergent des populations de *P. syringae* épi- et endophytes.

La coexistence de souches de *P. syringae* appartenant aux différentes lignées génétiques soulève la question des interactions entre ces souches et la possible existence d'un pathobiome tel que décrit précédemment.

### **II.1. Les populations de *P. syringae* en lien avec les communautés des plantes couvre-sol**

Le couplage des isolements bactériens sur milieux de cultures non sélectifs et semi-sélectifs des *P. syringae* avec les marqueurs moléculaires spécifiques développés dans le chapitre 1, ont permis une quantification de la structure des populations de *P. syringae* en termes des phylogroupes. Les résultats indiquent que les plantes couvre-sol hébergent des populations de *P. syringae* constituées de souches appartenant à une diversité de groupes phylogénétiques. De plus, les analyses ont mis en évidence une influence de la composition des communautés de plantes couvre-sol sur celles des *P. syringae* qui y sont associées. La structure et l'abondance des populations de *P. syringae* diffèrent en fonction de la densité et la richesse spécifique du couvert végétal, ainsi que la présence de certaines familles ou



espèces végétales. Une corrélation négative significative entre l'abondance de *Prunella vulgaris*, une espèce de la famille des Lamiaceae, et l'abondance de *P. syringae* a pu être mise en évidence dans les vergers de kiwis où cette plante était présente. Compte tenu de l'activité antimicrobienne *in vitro* de certaines molécules produites par *P. vulgaris* (Psotova *et al.*, 2003; Sarac and Ugur, 2007; Kirbag *et al.*, 2009), cette observation suggère qu'il serait possible d'utiliser *P. vulgaris* comme levier pour moduler les populations de *P. syringae* des couvre-sols et ainsi réduire la pression d'inoculum vis-à-vis des arbres fruitiers. De ce fait, cette hypothèse a été investiguée en parcelle expérimentale avec reproduction d'un couvre-sol dans lequel l'abondance des populations de *P. syringae* a été évaluée après introduction de *P. vulgaris*.

## **II.2. Influence de la gestion de la couverture végétale sur les populations de *P. syringae* des arbres fruitiers**

L'étude simultanée des populations de *P. syringae* des plantes couvre-sol et des arbres fruitiers a mis en évidence la coexistence de souches appartenant aux mêmes lignées génétiques au niveau de ces deux compartiments. Les séquences *cts* indiquent que certaines de ces souches sont très proches, et donc que des échanges ont lieu entre les populations de *P. syringae* associées aux couverts végétaux et celles des arbres fruitiers. De plus, les résultats mettent en évidence que la gestion de l'enherbement du rang influe sur les communautés de *P. syringae* associées aux arbres fruitiers. Les populations de *P. syringae* des bourgeons de kiwis sont plus abondantes lorsque les rangs sur lesquels sont plantées les vignes sont enherbés. Il est possible que la tonte des couverts végétaux situés sous les arbres entraîne la formation de particules aérosols renfermant des *P. syringae*. Celles-ci vont se déposer sur les

organes aériens des arbres et ainsi participer à l'établissement, ou au renforcement de l'effectif, de populations de *P. syringae* sur ceux-ci. Néanmoins, on ne sait pas dans quelle mesure l'abondance des populations de *P. syringae* influe sur l'émergence de maladies puisqu'un des vergers de kiwis de l'étude (K3), enherbé sur les rangs, présente des populations de *P. syringae* très abondantes mais est dépourvu de symptômes, et qu'un des vergers d'abricotiers (P1), dépourvu de couvert végétal, présente un taux de mortalité des arbres très élevé. La pluie contribue très certainement au lessivage des populations de *P. syringae* des arbres vers les couverts végétaux. Cependant, il est possible que les éclaboussures en provenance des couvre-sols puissent prendre part en retour à l'inoculation des arbres, surtout lorsque ceux-ci possèdent une canopée très basse en contact avec les plantes couvre-sol tel que nous l'avons observé dans les vergers de kiwis.

Enfin, un possible antagonisme est observé entre les souches de *P. syringae* des phylogroupes 1 et 2. Cependant, cet antagonisme reste hypothétique du fait qu'il pourrait s'agir du résultat de l'intervention d'autres facteurs tels que les conditions environnementales. Par exemple, selon les conditions environnementales ce serait l'un ou l'autre des deux phylogroupes qui serait avantagé, donnant une impression d'antagonisme.

### **II.3. Tentative de réduction de la pression d'inoculum exercée par les couvre-sols par gestion de la composition de leur communauté végétale**

Une parcelle expérimentale a été mise en place à l'automne 2015 afin de vérifier s'il était effectivement possible de diminuer l'abondance des *P. syringae* d'un couvre-sol expérimental en y introduisant *P. vulgaris*, tels que le suggèrent les résultats du chapitre 2. Deux prélèvements ont été effectués, un premier en avril et un second en juin 2016. Cependant, les

résultats préliminaires indiquent que la présence de *P. vulgaris* ne semble pas diminuer l'abondance des *P. syringae*.

En parallèle il a été vérifié que les résultats issus à partir des échantillons de terrain n'étaient pas le fait d'un biais de manipulation. Effectivement, compte tenu de la production de molécules aux propriétés antimicrobiennes par *P. vulgaris*, les dénombrements bactériens plus faibles auraient pu être le résultat de l'étalement de ces molécules sur les milieux de cultures après traitement des échantillons. Les dénombrements bactériens obtenus à partir d'échantillons des trois espèces de plantes couvre-sol utilisées, *F. arundinacea*, *L. perenne* et *T. repens*, étaient similaires à ceux de mélanges de celles-ci avec *P. vulgaris*. Les résultats observés à partir des échantillons de terrain ne sont donc pas un biais de traitement.

Malgré l'absence de diminution de l'abondance des *P. syringae* en présence de *P. vulgaris* lors des deux prélèvements, des effets variables de la composition des communautés de plantes couvre-sol ont tout de même été observés. Tout comme pour ceux observés à partir des échantillons de terrain, ces effets ne sont pas constants et d'autres paramètres inconnus à l'heure actuelle semblent également entrer en jeu. Il est très probable que les paramètres physico-chimiques du sol, l'humidité, la température, l'âge et la gestion des couvre-sols font partie des paramètres intervenant dans les effets observés. Le couvre-sol expérimental utilisé pour vérifier la reproductibilité des observations de terrain est implanté depuis moins d'une année. Les communautés bactériennes changent avec l'âge des plantes (Hirano and Upper, 1991), et il est possible qu'elles ne soient pas encore totalement stabilisées. Un suivi plus long de l'abondance des *P. syringae* au sein de cette parcelle permettrait de vérifier si la maturation des plants de *P. vulgaris* soit reliée à une diminution de l'abondance de *P. syringae*. En plus d'être installés depuis plusieurs années, les couvre-sols des vergers subissent plusieurs tontes annuelles. La dégradation de la litière issue de ces tontes pourrait être impliquée dans des

modifications des populations de *P. syringae*, mais également de la communauté bactérienne dans son ensemble. Les modifications des populations de *P. syringae* pourraient aussi être le résultat de réponses à des composés volatils ou solubles issus de la décomposition de la litière des plantes couvre-sol, ou encore à l'installation de microorganismes antagonistes favorisée par certaines espèces végétales ou pratiques culturales. Effectivement, des effets ce type sont observés chez les communautés microbiennes du sol. Ces communautés sont modulées par les exsudats racinaires des plantes couvre-sol. Selon les espèces de plantes couvre-sol utilisées, cela peut favoriser l'installation de microorganismes bénéfiques pour la santé des plantes par leur action antagoniste vis-à-vis de certains pathogènes ou encore la sécrétion de composés utiles aux plantes (Vukicevich *et al.*, 2016).

### **III. Perspectives de recherche**

Les résultats obtenus au cours des trois dernières années indiquent que les couvre-sols végétaux sont impliqués dans des échanges microbiens avec les arbres fruitiers. Etant donné les observations faites, il semblerait que le désherbage du rang permette de diminuer la pression d'inoculum exercée sur les arbres fruitiers et ainsi réduire l'abondance des populations de *P. syringae* qui y sont associées. Les résultats indiquent également que la composition des communautés de plantes couvre-sol influe les populations de *P. syringae* qui y sont associées, ce qui laisse envisager qu'une gestion spécifique de la pousse et de la composition des communautés de plantes couvre-sol puisse servir de levier pour contrôler les populations de *P. syringae* des vergers. Néanmoins, malgré l'identification d'une espèce végétale, *Prunella vulgaris*, pouvant potentiellement être utilisée pour réduire les abondances de *P. syringae* des couvre-sols, la tentative en parcelle expérimentale n'a pas donné les

résultats escomptés. Compte tenu des différences de maturité entre ce couvre-sol expérimental et ceux des vergers, il serait intéressant de poursuivre l'évaluation de l'abondance des populations de *P. syringae* sur une durée plus longue. L'usage de *P. vulgaris* semblait prometteur compte tenu de la présence d'études *in vitro* démontrant l'activité antimicrobienne de *P. vulgaris* sur un certain nombre d'espèces dont des souches du genre *Pseudomonas*. Cependant, on ne sait pas si cette activité antimicrobienne s'exprime également *in situ*, et si oui au bout de combien de temps. A l'avenir il s'agira de tenter d'identifier d'autres espèces végétales, aux propriétés antimicrobiennes connues ou non, ayant une influence sur les populations de *P. syringae*. Il faudra également identifier les conditions environnementales dans lesquelles ces effets sont observés car il est possible que ceux-ci soient le résultat d'interactions synergiques entre deux ou plusieurs espèces végétales. L'exploration du reste de la communauté microbienne pourrait potentiellement amener à l'identification d'espèces antagonistes des pathogènes des arbres fruitiers.

Malgré la présence de populations de *P. syringae* très abondantes sur les couvre-sols, cela ne semble pas être le facteur principal de l'émergence de maladies des arbres fruitiers : on peut citer deux cas de figure, le verger d'abricotiers P1 sans couvert végétal et dont les arbres présentent de nombreux symptômes et au taux de mortalité très élevé, et le verger de kiwis K3 intégralement enherbé et totalement dépourvu de symptômes.

Compte tenu de l'ubiquité de *P. syringae* et de la présence de populations très abondantes au sein de vergers sains et dépourvus de symptômes, l'émergence des maladies est très probablement le résultat de l'apparition d'un déséquilibre dans les populations de *P. syringae* suite à une perturbation de l'écosystème, favorisant l'installation d'une communauté dominée par une lignée pathogène. Les traitements cupriques répétés peuvent faire partie de ces perturbations. Cependant, d'autres facteurs tels que des tailles mal programmées, une

mauvaise gestion du couvert végétal et des débris de tailles, l'apport exogène de souches pathogènes via du matériel végétal ou agricole contaminé, ou encore des conditions environnementales fragilisant les arbres et favorisant leur colonisation par les agents pathogènes, semblent également propice au déséquilibre des communautés de *P. syringae* des vergers.

Enfin, pour les années à venir le suivi de la parcelle expérimentale sera assuré par les membres de mon équipe d'accueil (MISTRAL). L'objectif à long terme étant de voir si la maturation du couvre-sol et des plants de *Prunella vulgaris* influent sur les communautés de *P. syringae*. De plus les effets de la tonte et de la dégradation de la litière seront également pris en compte, et de nouveaux protocoles permettant d'identifier la direction dominante des échanges microbiens entre les couvre-sols et les arbres, ainsi que les conditions favorisant ces échanges, seront testés. Le suivi des vergers d'abricotiers et de kiwis sera également reconduit par mes collègues dès l'année prochaine, et de nouveaux projets sont en cours d'élaboration afin d'étendre la zone de prospection et mettre au point des collaborations avec des professionnels de l'arboriculture pour les années à venir.

## Références hors articles

---

- Abelleira, A., Lopez, M.M., Penalver, J., Aguin, O., Mansilla, J.P., Picoaga, A., and al. (2011) First report of bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Spain. *Plant Pathol* **51**: 798-798.
- Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.-L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., Van Dijk, K., and Collmer, A. (2000) The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 4856-4861.
- Alleinikova, M.M., and Utrobina, N.M. (1975) Changes in the structure of animal populations in soil under the influence of farm crops. In *Progress in Soil Zoology*. Vanek, J. (ed). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 429-435.
- Allison, F.E. (1973) *Soil organic matter and its role in crop production*. Amsterdam: Elsevier.
- Altieri, M.A. (1995) *Agroecology: the science of sustainable agriculture*. Boulder: Westview Process.
- Anderson, J.L., Bingham, G.E., and Hill, R.W. (1992) Effects of permanent cover crop competition on sour cherry tree evapotranspiration, growth and productivity. *Acta Hort* **313**: 135-142.
- Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Gril, J.N., Guichard, L., Lucas, P. et al. (2007) *Pesticides, agriculture et environnement*. Quae.
- Baca, S., and Moore, L.W. (1987a) *Pseudomonas syringae* colonization of grass species and cross infectivity to woody nursery plants. *Plant Dis* **71**: 724-726.
- Baca, S., and Moore, L.W. (1987b) Variations in *Pseudomonas syringae* isolated from grass species occurring in woody plant nurseries in the Pacific Northwest. *Plant dis* **71**: 724-726.
- Baeumer, K., and Bakermans, W.A.P. (1974) Zero-tillage. *Ad Agro* **25**: 77-123.
- Baggs, E.M., Watson, C.A., and Rees, R.M. (2000) The fate of nitrogen from incorporated cover crop and green manure residues. *Nutr Cycl Agroecosyst* **56**: 153-163.
- Baldi, I., Mohammed-Brahim, B., Brochard, P., Dartigues, J.F., and Salamon, R. (1998) Delayed health effects of pesticides: review of current epidemiological knowledge. *Rev Epidemiol Sante Publique* **46**: 134-142.
- Balestra, G.M., Renzi, M., and Mazzaglia, A. (2010) First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal. *New Dis Rep* **22**: 10-10.
- Balestra, G.M., Renzi, M., and Mazzaglia, A. (2011) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit plants in Spain. *New Dis Rep* **24**: 10-10.
- Balestra, G.M., Taratufolo, M.C., Vinatzer, B.A., and Mazzaglia, A. (2013) A multiplex PCR assay for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and differentiation of populations with different geographic origin. *Plant Dis* **97**: 472-478.
- Balestra, G.M., Mazzaglia, A., Quattrucci, A., Renzi, M., and Rossetti, A. (2009a) Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Jin Tao kiwi plants in Italy. *Phytopathol Med* **48**: 299-301.
- Balestra, G.M., Mazzaglia, A., Quattrucci, A., Renzi, M., and Rossetti, A. (2009b) Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australasian Plant Dis Notes* **4**: 34-36.
- Bartoli, C., Berge, O., Monteil, C.L., Guilbaud, C., Balestra, G.M., Varvaro, L. et al. (2014) The *Pseudomonas viridiflava* phylogroups in the *P. syringae* species complex are characterized by genetic variability and phenotypic plasticity of pathogenicity-related traits. *Env Microbiol* **16**: 2301-2315.
- Bartoli, C., Lamichhane, J.R., Berge, O., Guilbaud, C., Varvaro, L., Balestra, G.M. et al. (2015) A framework to gauge the epidemic potential of plant pathogens in environmental reservoirs: the example of kiwifruit canker. *Mol Plant Pathol* **16**: 137-149.
- Bastas, K.K., and Karakaya, A. (2012) First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Turkey. *Plant Dis* **96**: 452-452.
- Bauer, P.J., and Reeves, D.W. (1999) A comparison of winter cereal species and planting dates as residue cover for cotton grown with conservation tillage. *Crop Sci* **39**: 1824-1830.
- Baughner, T.A., Elliott, K.C., and Glenn, D.M. (1995) Effect of Sod Competition and Root Pruning on Stayman Apple Tree Growth and Fruit Cracking. *HortSci* **30**: 222-226.
- Baumgartner, K., Steenwerth, K.L., and Veilleux, L. (2007) Effects of organic and conventional practices on weed control in a perennial cropping system. *Weed Sci* **55**: 352-358.
- Baver, L.D., Gardner, W.H., and Gardner, W.R. (1972) *Soil physics*. London: John Wiley and Sons.



- Baxter, P. (1970) Orchard soil management trials. 1. Effect of a weed-free or straw mulched strip on the growth and yield of young fruit trees. *Ani Prod Sci* **10**: 467-473.
- Bedford, D.O., and Pickering, S. (1919) *Science and fruit growing*. London: Macmillan and Co.
- Bender, C.L., Alarcón-Chaidez, F., and Gross, D.C. (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 266-292.
- Bennett, O.L., Stanford, G., Mathias, E.L., and Lundberg, P.E. (1975) Nitrogen conservation under corn planted in quackgrass sod. *J Environ Qual* **4**: 107-110.
- Berge, O., Monteil, C.L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D.C., and Morris, C.E. (2014) A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS one* **9**: e105547.
- Billing, E. (1970) *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder, 1930; Clara 1934). *J App Bacteriol* **33**: 492-500.
- Birch, H.F. (1958) The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant Soil* **10**: 9-31.
- Blasse, W. (1961) Frosttiefe in Abhängigkeit von der Bodenpflege im Obstbau. *Gartenbau* **87**: 108-110.
- Blevins, R.L., Thomas, G.W., and Cornelius, P.L. (1977) Influence of no-tillage and nitrogen fertilization on certain soil properties after 5 years of continuous corn. *Agro J* **69**: 383-386.
- Bodilis, J., and Barry, S. (2006) Molecular evolution of the major outer-membrane protein gene (*oprF*) of *Pseudomonas*. *Microbiol* **152**: 1075-1088.
- Bollard, E.G. (1957) Effect of a permanent grass cover on apple tree yield in the first years after grassing. *NZJ Sci. Technol Sect A* **38**: 527-532.
- Bould, C., and Jarrett, R.M. (1962) The effect of cover crops and NPK fertilizers on growth, crop yield and leaf nutrient status of young dessert apple trees. *J Horticult Sci* **37**: 58-82.
- Bould, C., and Ingram, J. (1974) Main effects and interactions of grass-clover sward and NPK fertilizers on dessert plums. *Exp Hort* **26**: 44-59.
- Bould, C., Tolhurst, J.A.H., and Jarrett, R.M. (1949) Cover crops in relation to soil fertility and tree nutrition. An experiment with bush cider trees. Progress report-II. *Ann Rep L Ash Agri Hort Res S* **1948**: 37-46.
- Bould, C., Hughes, H.M., and Gunn, E. (1972) Effects of soil management and NPK fertilizers on tree growth, yield and leaf-nutrient composition of dessert apples. *Exp Hort* **24**: 25-36.
- Bradbury, J.F. (1986) *Guide to plant pathogenic bacteria*. Slough: CAB international Mycological Institute.
- Breil, K. (1999) Mulchrasen im obst-und weinbau: arten, sorten, mischungen. *Erwerbs Obstbau* **41**: 61-63.
- Brown, M.W. (2001) Flowering ground cover plants for pest management in peach and apple orchards. *IOBC WPRS Bull* **24**: 379-382.
- Brown, M.W., and Tworowski, T. (2004) Pest management benefits of compost mulch in apple orchards. *Agri Ecosys Env* **103**: 465-472.
- Bugg, R.L. (1991) Cover crops and control of arthropod pests of agriculture. In *Cover Crops for Clean Water*. Hargrove, W.L. (ed). Ankeny, Iowa: Soil and Water Conservation Society, pp. 157-163.
- Bugg, R.L. (1992) Using cover crops to manage arthropods on truck farms. *HortSci* **27**: 741-745.
- Bugg, R.L., and Waddington, C. (1994) Using cover crops to manage arthropod pests of orchards: a review. *Agri Ecosys Env* **50**: 11-28.
- Bulfin, M., and Gleeson, T. (1967) A Study of Surface Soil Conditions under a Non-Cultivation Management System: I. Physical and Chemical Properties. *Irish J Agri Res* **6**: 177-188.
- Bull, C.T., Clarke, C.R., Cai, R., Vinatzer, B.A., Jardini, T.M., and Koike, S.T. (2011) Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathol* **101**: 847-858.
- Burdon, J.J., and Leather, S.R. (1990) *Pests, pathogens and plant communities*. Cambridge: Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Buser, H.R. (1990) Atrazine and other s-triazine herbicides in lakes and in rain in Switzerland. *Env Sci Technol* **24**: 1049-1058.

- Butler, M.I., Stockwell, P.A., Black, M.A., Day, R.C., Lamont, I.L., and Poulter, R.T.M. (2013) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker belong to different clones that originated in China. *PLoS one* **8**: e57464.
- Cambardella, C.A., and Elliott, E.T. (1993) Carbon and nitrogen distribution in aggregates from cultivated and native grassland soils. *Soil Sci Soc Am J* **57**: 1071-1076.
- Cameron, H.R. (1962) Mode of infection of sweet cherry trees. *Phytopathol* **52**: 917-921.
- Campbell, C.A. (1978) Soil organic carbon, nitrogen and fertility. In *Soil Organic Matter*. Schnitzer, M., and Khan, S.U. (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 173-271.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.-C., Shaw, P.D., and Farrand, S.K. (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant-Mic Interact* **11**: 1119-1129.
- Chapman, J., Taylor, R., and Alexander, B. (2011) Second report on characterisation of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolates in New Zealand. *Min Agri Fores Rep* **10**.
- Charkowski, A.O., Alfano, J.R., Preston, G., Yuan, J., He, S.Y., and Collmer, A. (1998) The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *J Bacteriol* **180**: 5211-5217.
- Cheng, H.Y., Wan, S., Zhan, J., Ping, Q., and Li, G. (1995) Pathogen identification of kiwifruit bacterial canker in Anhui. *J Anhui Agric Univ* **22**: 219-223.
- Childers, N.F. (1961) Modern fruit science. *Soil Sci* **91**: 222-222.
- Cockroft, B., and Wallbrink, J.C. (1966) Root distribution of orchard trees. *Crop Past Sci* **17**: 49-54.
- Cockroft, B., and Tisdall, J.M. (1978) Soil management, soil structure and root activity. In: *Modification of soil structure*. WW Emerson, RD, Bond, AR Dexter (eds). Wiley: Chichester, pp. 387-391
- Codron, J.M., Habib, R., Jacquet, F., and Sauphanor, B. (2003) Bilan et perspectives environnementales de la filière arboriculture fruitière. In *Les Dossiers de l'Environnement de l'INRA 23: Agriculture, territoire, environnement dans les politiques européennes*. Quae (ed), pp. 31-68.
- Cody, Y.S., Gross, D.C., Proebsting Jr, E.L., and Spotts, R.A. (1987) Suppression of ice nucleation-active *Pseudomonas syringae* by antagonistic bacteria in fruit tree orchards and evaluations of frost control. *Phytopathol* **77**: 1036-1044.
- Coker, E.G. (1959) Root development of apple trees in grass and clean cultivation. *J Hort Sci* **34**: 111-121.
- Comai, M., Corradini, F., Porro, D., and Failla, O. (1993) Effect of nitrogen supply in herbicide strips or in grass alleys on apple growth, yield and fruit quality. *Min Nut Dec Fruit Plant* **383**: 83-88.
- Constantinidou, H., Hirano, S.S., Baker, L.S., and Upper, C.D. (1990) Atmospheric dispersal of ice nucleation-active bacteria: The role of rain. *Phytopathol* **80**: 934-937.
- Cooksey, D.A. (1994) Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **14**: 381-386.
- Cooper, A.J. (1973) Root Temperature and Plant Growth. In *Commonwealth Bureaux of Horticulture and Plantation Crops. Research Review*.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol* **49**: 711-745.
- Coventry, J.M., Fisher, K.H., Strommer, J.N., and Reynolds, A.G. (2005) Reflective mulch to enhance berry quality in Ontario wine grapes. *Acta Hort* **689**: 95-101.
- Creamer, N.G., and Baldwin, K.R. (2000) An evaluation of summer cover crops for use in vegetable production systems in North Carolina. *HortSci* **35**: 600-603.
- Creamer, N.G., Bennett, M.A., Stinner, B.R., and Cardina, J. (1996) A comparison of four processing tomato production systems differing in cover crop and chemical inputs. *J Am Soc Hort Sc* **121**: 559-568.
- Crosse, J.E. (1956) Bacterial canker of stone fruits II. Leaf scar infection of Cherry. *J Hort Sci* **31**: 212-224.
- Crosse, J.E. (1957) Bacterial canker of stone fruits III. Inoculum concentration and time of inoculation in relation to leaf scar infection of cherry. *Ann Appl Biol* **45**: 19-35.
- Crosse, J.E. (1959) Bacterial canker of stone-fruits. IV. Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. *Ann Appl Biol* **47**: 306-317.

- Crosse, J.E. (1966) Epidemiological relations of the pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. *Ann Rev Phytopathol* **4**: 291-310.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- Danso, S.K.A., and Curbelo, S. (1991) Herbage yield and nitrogen-fixation in a triple-species mixed sward of white clover, lotus and fescue. *Soil Biol Biochem* **23**: 65-70.
- Davis, J.R., and English, H. (1969) Factors related to development of bacterial canker in peach. *Phytopathol* **59**: 588-588.
- Derpsch, R. (1990) Do crop rotation and green manuring have a place in the wheat farming systems of the warmer areas? In 3. *International Conference on Wheat for the Nontraditional Warm Areas, Foz do Iguacu, Brazil*.
- Domsch, K.H. (1977) Biological aspects of soil fertility. In *Proceedings of the International Seminar on Soil Environment and Fertility Management in Intensive Agriculture, Tokyo, Japan*, pp. 737-743.
- Donati, I., Buriani, G., Cellini, A., Mauri, S., Costa, G., and Spinelli, F. (2014) New insights on the bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). *J Ber Res* **4**: 53-67.
- Dreo, T., Pirc, M., Ravnikar, M., Zezlina, I., Poliakoff, F., Rivoal, C. *et al.* (2014) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in Slovenia. *Euro J Plant Pathol* **98**: 1578-1578.
- Duffus, J.E. (1971) Role of weeds in the incidence of virus diseases. *Ann Rev Phytopathol* **9**: 319-340.
- Dumenyo, C.K., Mukherjee, A., Chun, W., and Chatterjee, A.K. (1998) Genetic and physiological evidence for the production of N-acyl homoserine lactones by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and other fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* species. *Euro J Plant Pathol* **104**: 569-582.
- Dye, D.W., Bradbury, J., Goto, M., Hayward, A.C., Lelliott, R.A., and Schroth, M.N. (1980) International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev Plant Pathol* **59**: 153-168.
- Ebelhar, S.A., Frye, W.W., and Blevins, R.L. (1984) Nitrogen from legume cover crops for no-tillage corn. *Agro J* **76**: 51-55.
- Edwards, C.A., and Lofty, J.R. (1975) The influence of cultivations on soil animal populations. In *Progress in soil zoology*. Vanek, J. (ed). Hague: Junk, W., pp. 399-407.
- Elliott, L.F., Papendick, R.I., and Bezdicek, D.F. (1987) Cropping practices using legumes with conservation tillage and soil benefits. In *The role of legumes in conservation tillage systems*. Power, J.F. (ed). Ankeny: Soil Conservation Society of America, pp. 81-89.
- Elmore, C., Roncoroni, J., Wade, L., and Verdegaal, P. (1997) Four weed management systems compared: Mulch plus herbicides effectively control vineyard weeds. *Cal Agri* **51**: 14-18.
- Enache, A.J., and Ilnicki, R.D. (1990) Weed control by subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) used as a living mulch. *Weed Technol* **4**: 534-538.
- Engel, G. (1960) Der Einfluss verschiedener Bodenpflegemaßnahmen auf das Klima im Obstbestand und auf die vegetative und generative Entwicklung der Obstgehölze. *Gartenbauwissenschaft* **25**: 67-106.
- Engel, G. (1992) Vergleich integrierter Unkrautbekämpfungsverfahren im Obstbau gegenüber der Verwendung von Herbiziden. *Rhein Monat Gem Ob Zierpfl* **13**: 505-511.
- English, H., and Davis, J.R. (1960) The source of inoculum for bacterial canker and blast of stone fruit trees. *Phytopathol* **50**.
- EPPO (2011a) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Germany. *EPPO Rep Ser* **9**: 2011/2185.
- EPPO (2011b) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Chile. *EPPO Rep Ser* **3**: 2011/2055.
- EPPO (2011c) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Australia. *EPPO Rep Ser* **6**: 2011/2130.
- EPPO (2011d) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Switzerland. *Australas Plant Dis No* **8**: 2011/2168.
- Epstein, D.L., Zack, R.S., Brunner, J.F., Gut, L., and Brown, J.J. (2000) Effects of broad-spectrum insecticides on epigeal arthropod biodiversity in Pacific Northwest apple orchards. *Env Entomol* **29**: 340-348.
- Ercolani, G.L. (1967) Aspetti di *Pseudomonas syringae* nei frutteti emiliani. *Info Fitopatol* **17**: 205-215.

- Ercolani, G.L., Hagedorn, D.J., Kelman, A., and Rand, R.E. (1974) Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean in Wisconsin. *Phytopathol* **64**: 1330-1339.
- Everett, K.R., Taylor, R.K., Romberg, M.K., Rees-George, J., Fullerton, R.A., Vanneste, J.L., and Manning, M.A. (2011) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Australas Plant Dis No* **6**: 67-71.
- Fageria, N.K., Baligar, V.C., and Bailey, B.A. (2005) Role of cover crops in improving soil and row crop productivity. *Comm Soil Sci Plant An* **36**: 2733-2757.
- Fang, Y., Zhu, X., and Wang, Y. (1990) Preliminary studies on kiwifruit diseases in Hunan Province. *Sichuan Fruit Sci Technol* **18**: 28-29.
- Ferrante, P., and Scortichini, M. (2010) Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathol* **59**: 954-962.
- Ferrante, P., and Scortichini, M. (2014) Frost promotes the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* plants. *Plant Pathol* **63**: 12-19.
- Fisher, V.J., Ralph, E.H., and Williams, D.B. (1961) Effect of apple soil management practices upon growth, fruitfulness and fruit quality. *Del Agric Exp Stn Tech Bull* **336**: 31-31.
- Flexner, J.L., Westigard, P.H., Gonzalves, P., and Hilton, R. (1991) The effect of groundcover and herbicide treatment on two spotted spider mite density and dispersal in southern Oregon pear orchards. *Entomol Exp App* **60**: 111-123.
- Foulkes, J.A., and Lloyd, A.B. (1980) Epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. syringae* pv. *morsprunorum* on cherry leaves. *Australas Plant Pathol* **9**: 114-115.
- Fourie, J.C., Louw, P.J.E., and Agenbag, G.A. (2006) Cover crop management in a Chardonnay/99 Richter vineyard in the Coastal wine grape region, South Africa. 1. Effect of two management practices on selected grass and broadleaf species. *S Afr J Enol Vitic* **27**: 167-177.
- Fredrikson, L., Skinkis, P.A., and Peachey, E. (2011) Cover crop and floor management affect weed coverage and density in an establishing Oregon vineyard. *HortTechnol* **21**: 208-216.
- Freyman, S. (1989) Living mulch ground covers for weed control between raspberry rows. *Acta Hortic* **262**: 349-354.
- Fribourg, H.A., and Johnson, I.J. (1955) Dry matter and nitrogen yields of legume tops and roots in the fall of the seeding year. *Agro J* **47**: 73-77.
- Fritsch, J., Bourgoïn, B., and Picard, C. (2012) Le PSA, grave bactériose, est sur kiwi en France: Synthèse du plan de surveillance coordonné par le Ministère chargé de l'Agriculture en 2011, ses résultats et les conseils qui en découlent. *Phytoma - Def Vég* **650**: 22-25.
- Frye, W.W. (1986) Economics of legume cover crops. *Soil Sci New View Coop Ext Serv Univ Ky Coll of Agric Dep Agro* **7**: 2-2.
- Frye, W.W., Smith, W.G., and Williams, R.J. (1985) Economics of winter cover crops as a source of nitrogen for no-till corn. *J Soil Water Cons* **40**: 246-249.
- Frye, W.W., Blevins, R.L., Smith, M.S., Corak, S.J., and Varco, J.J. (1988) Role of annual legume cover crops in efficient use of water and nitrogen. In *Cropping Strategies for Efficient Use of Water and Nitrogen*. Hargrove, W.L. (ed). Madison: ASA Special Publication No. 51, pp. 129-153.
- Fye, R.E. (1980) Weed sources of Lygus bugs in the Yakima Valley and Columbia Basin in Washington. *J Econ Entomol* **73**: 469-473.
- Gago, P., Cabaleiro, C., and Garcia, J. (2007) Preliminary study of the effect of soil management systems on the adventitious flora of a vineyard in northwestern Spain. *Crop Prot* **26**: 584-591.
- Gaignard, J.L., and Luisetti, J. (1992) Efficacy of copper chelate to control bacterial dieback of peaches. In *8th Int Conf Plant Pathogen Bacteria*. Versailles.
- Gaignard, J.L., and Luisetti, J. (1993) *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Agronomie* **13**: 333-370.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., and Grimont, P.A.D. (1999) DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov.(ex Sutic and Dowson 1959). *Int J Sys Bacteriol* **49**: 469-478.

- Gasser, H. (1990) Glyphosate in autumn-also after frosts? *Obst Wein* **27**: 210-210.
- Gitaitis, R., Walcott, R., Culpepper, S., Sanders, H., Zolobowska, L., and Langston, D. (2002) Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. *Crop Prot* **21**: 983-989.
- Glenn, D.M., and Welker, W.V. (1989) Cultural practices for enhanced growth of young peach trees. *Am J Alt Agric* **4**: 8-11.
- Glenn, D.M., and Welker, W.V. (1991) Control tree productivity through root systems: orchard floor systems of the future. *Comp Fruit Tree* **24**: 45-46.
- Goode, J.E., and Hyrycz, K.J. (1976) The effect of nitrogen on young, newly-planted, apple rootstocks in the presence and absence of grass competition. *J Hortic Sci* **51**: 321-327.
- Goto, M. (1991) Plasmids associated with the resistance to copper and streptomycin in *Pseudomonas syringae* pv *actinidiae*. In *4th int working group Pseudomonas syringae pathovars*. Firenze.
- Goto, M., Hikota, T., Nakajima, M., Takikawa, Y., and Tsuyumu, S. (2004) Occurrence and properties of copper resistance in plant pathogenic bacteria. *Ann Phytopathol Soc Jap* **60**: 147-153.
- Granatstein, D., and Mullinix, K. (2008) Mulching options for northwest organic and conventional orchards. *HortSci* **43**: 45-50.
- Granatstein, D., Andrews, P., and Groff, A. (2014) Productivity, economics, and fruit and soil quality of weed management systems in commercial organic orchards in Washington State, USA. *Orga Agric* **4**: 197-207.
- Gray, D.M., Swanson, J., and Dighton, J. (2012) The influence of contrasting ground cover vegetation on soil properties in the NJ pine barrens. *Appl Soil Ecol* **60**: 41-48.
- Greacen, E.L. (1958) The soil structure profile under pastures. *Crop Past Sci* **9**: 129-137.
- Green, R.L., and Warren, G.J. (1985) Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. *Nature* **317**: 645-648.
- Greenland, D.J. (1971) Changes in the nitrogen status and physical condition of soils under pastures, with special reference to the maintenance of the fertility of Australian soils used for growing wheat. *Soil Ferti* **34**: 237-251.
- Groves, R.L., Walgenbach, J.F., Moyer, J.W., and Kennedy, G.G. (2002) The role of weed hosts and tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, in the epidemiology of Tomato spotted wilt virus. *Plant Dis* **86**: 573-582.
- Guerra, B., and Steenwerth, K. (2012) Influence of floor management technique on grapevine growth, disease pressure, and juice and wine composition: a review. *Am J Enol Vitic* **63**: 149-164.
- Guilbaud, C., Morris, C.E., Barakat, M., Ortet, P., and Berge, O. (2016) Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. *FEMS Microbiol Ecol* **92**: fiv146.
- Guttman, D.S., Vinatzer, B.A., Sarkar, S.F., Ranall, M.V., Kettler, G., and Greenberg, J.T. (2002) A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **295**: 1722-1726.
- Hall, J.K., Hartwig, N.L., and Hoffman, L.D. (1984) Cyanazine losses in runoff from no-tillage corn in "living" and dead mulches vs. unmulched, conventional tillage. *J Environ Qual* **13**: 105-110.
- Hall, J.K., Murray, M.R., and Hartwig, N.L. (1989) Herbicide leaching and distribution in tilled and untilled soil. *J Env Qual* **18**: 439-445.
- Hammermeister, A.M. (2016) Organic weed management in perennial fruits. *Sci Hortic* **208**: 28-42.
- Hardisty, S.E. (1966) The elimination of cultivation in apple orchards - a new approach to orchard management. *J. Agric. W. Aust.* **7**: 79-86.
- Hargrove, W.L. (1986) Winter legumes as a nitrogen source for no-till grain sorghum. *Agro J* **78**: 70-74.
- Hartwig, N.L. (1988) Crownvetch and min-or no-tillage crop production for soil erosion control. *Weed Sci* **28**: 98-99.
- Haynes, R.J. (1980) Influence of soil management practice on the orchard agro-ecosystem. *Agro-Ecosys* **6**: 3-32.
- He, S.Y., Huang, H.-C., and Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin Pss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**: 1255-1266.

- Hegazi, A. (2000) Plastic mulching for weed control and water economy in vineyards. *Acta Hort* **536**: 245-250.
- Hilkenbaumer, F., and Kolbe, W. (1974) Einfluss verschiedener Bodenpflegemaßnahmen und der Herbizid-Streifenbehandlung auf Ertrag, Fruchtqualität und Krankheitsbefall von Apfelsorten im Dauerversuch Hofchen während des Vollertrages. *Erwerbsobstbau* **16**: 37-42.
- Himmelsbach, J. (1992) Wirkung und Wirtschaftlichkeit alternativer Bodenpflegeverfahren in Apfel-Intensivanlagen. *Erwerbsobstbau* **34**: 47-52.
- Hipps, N.A., and Samuelson, T.J. (1991) Effects of long-term herbicide use, irrigation and nitrogen fertilizer on soil fertility in an apple orchard. *J Sci Food Agric* **55**: 377-387.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D. (1989) Diel variation in population size and ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* on snap bean leaflets. *App Env Microbiol* **55**: 623-630.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D. (1990) Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Ann Rev Phytopathol* **28**: 155-177.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D. (1991) Bacterial community dynamics. In *Microbial ecology of leaves*. Andrews, J.H., and Hirano, S.S. (eds). New York: Springer-Verlag, pp. 271-294.
- Hirano, S.S., and Upper, C.D. (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 624-653.
- Hirano, S.S., Charkowski, A.O., Collmer, A., Willis, D.K., and Upper, C.D. (1999) Role of the Hrp type III protein secretion system in growth of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a on host plants in the field. *Proc Nat Ac Sci* **96**: 9851-9856.
- Hirano, S.S., Clayton, M.K., and Upper, C.D. (1994) Estimation of and temporal changes in means and variances of populations of *Pseudomonas syringae* on snap bean leaflets. *Phytopathol* **84**: 934-939.
- Hirano, S.S., Baker, L.S., and Upper, C.D. (1996) Raindrop momentum triggers growth of leaf-associated populations of *Pseudomonas syringae* on field-grown snap bean plants. *App Env Microbiol* **62**: 2560-2566.
- Hirano, S.S., Rouse, D.I., Clayton, M.K., and Upper, C.D. (1995) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and bacterial brown spot of snap bean: A study of epiphytic phytopathogenic bacteria and associated disease. *Plant Dis* **79**: 1085-1093.
- Hogue, E.J., and Neilsen, G.H. (1987) Orchard floor vegetation management. *Hortic Rev* **9**: 377-430.
- Holderbaum, J.F., Decker, A.M., Messinger, J.J., Mulford, F.R., and Vough, L.R. (1990) Fall-seeded legume cover crops for no-tillage corn in the humid East. *Agro J* **82**: 117-124.
- Hornig, R., and Bunemann, G. (1992) Fertigation and controlled strip cover by weeds in IP apple orchards. *Acta Hort* **335**: 65-72.
- Hostetler, G.L., Merwin, I.A., Brown, M.G., and Padilla-Zakour, O. (2007a) Influence of undervine floor management on weed competition, vine nutrition, and yields of Pinot noir. *Am J Enol Vitic* **58**: 421-430.
- Hostetler, G.L., Merwin, I.A., Brown, M.G., and Padilla-Zakour, O. (2007b) Influence of geotextile mulches on canopy microclimate, yield, and fruit composition of Cabernet franc. *Am J Enol Vitic* **58**: 431-442.
- Hoyt, G.D. (1987) Legumes as a green manure in conservation tillage. In *The Role of Legumes in Conservation Tillage Systems*. Power, J.F. (ed). Ankeny: Soil Conservation Society of America, pp. 96-98.
- Hutchison, M.L., Tester, M.A., and Gross, D.C. (1995) Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *Mol. Plant Mic Interact* **8**: 610-620.
- Ingels, C.A. (1998) *Cover cropping in vineyards: a grower's handbook*. Oakland: University of California Agriculture and Natural Resources.
- Ingels, C.A., Lanini, T., Klonsky, K.M., and Demoura, R. (2013) Effects of weed and nutrient management practices in organic pear orchards. *Acta Hort* **1001**: 175-183.
- Janse, J.D., Rossi, P., Angelucci, L., Scortichini, M., Derks, J.H.J., Akkermans, A.D.L. et al. (1996) Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. nov, the Bacterium Causing Canker of Hazelnut (*Corylus avellana* L.)). *Sys App Microbiol* **19**: 589-595.

- Jasieniuk, M., Ahmad, R., Sherwood, A.M., Firestone, J.L., Perez-Jones, A., Lanini, W.T. *et al.* (2008) Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in California: distribution, response to glyphosate, and molecular evidence for an altered target enzyme. *Weed Sci* **56**: 496-502.
- Jin, Q., Thilmony, R., Zwiesler-Vollick, J., and He, S.-Y. (2003) Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Mic Inf* **5**: 301-310.
- Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones, A.L., and He, S.Y. (2001) Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* **40**: 1129-1139.
- Jones, J.B., Pohronezny, K.L., Stall, R.E., and Jones, J.P. (1986) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. *Phytopathol* **76**: 430-434.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Kacarava, P.M. (1961) The toxic effect of perennial herbage on fruit trees. *Vestn. sel'sk. Nauki* **6**: 106-108.
- Kamoun, S., and Kado, C.I. (1990) A plant-inducible gene of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* encodes an exocellular component required for growth in the host and hypersensitivity on nonhosts. *J Bacteriol* **172**: 5165-5172.
- Karp, K., Noormets, M., Starast, M., and Paal, T. (2004) The influence of mulching on nutrition and yield of Northblue blueberry. *Acta Hort* **715**: 301-305.
- Keith, L.M.W., and Bender, C.L. (1999) AlgT ( $\sigma_{22}$ ) Controls Alginate Production and Tolerance to Environmental Stress in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* **181**: 7176-7184.
- Kennelly, M.M., Cazorla, F.M., de Vicente, A., Ramos, C., and Sundin, G.W. (2007) *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. *Plant Dis* **91**: 4-17.
- Kenworthy, A.L. (1953) Moisture in orchard soils as influenced by age of sod and clean cultivation. *Mich. Q. Bull* **35**: 454-459.
- Kim, J.J., and Sundin, G.W. (2000) Regulation of the *ruAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 nanometers) radiation and analysis of *ruAB*-mediated mutability in vitro and in planta. *J Bacteriol* **182**: 6137-6144.
- Kim, J.J., and Sundin, G.W. (2001) Construction and Analysis of Photolyase Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas syringae*: Contribution of Photoreactivation, Nucleotide Excision Repair, and Mutagenic DNA Repair to Cell Survival and Mutability following Exposure to UV-B Radiation. *App Env Microbiol* **67**: 1405-1411.
- Kim, K.-C., Kim, Y.-C., and Cho, B.-H. (1989) Antagonistic activity of an isolate of *Candida* species to ice nucleation-active *Pseudomonas syringae*. *Phytopathol* **79**: 275-277.
- King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* **44**: 301-307.
- Kiraly, Z., El-Zahaby, H.M., and Klement, Z. (1997) Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *J Phytopathol* **145**: 59-68.
- Kirbag, S., Zengin, F., and Kursat, M. (2009) Antimicrobial activities of extracts of some plants. *Pak. J. Bot* **41**: 2067-2070.
- Kishun, R., and Sohi, H.S. (1979) Two new hosts for *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson. *Curr Sci* **48**: 485-486.
- Klement, Z., Rozsnyay, D.S., Balo, E., Panczel, M., and Prileszky, G. (1984) The effect of cold on development of bacterial canker in apricot trees infected with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiol Plant Pathol* **24**: 237-246.
- Koh, Y.J., Park, S.Y., and Lee, D.H. (1996) Characteristics of bacterial canker of kiwifruit occurring in Korea and its control by trunk injection. *Korean J Plant Pathol* **12**: 324-330.
- Koh, Y.J., Chung, H.J., Cha, B.J., and Lee, D.H. (1994) Outbreak and spread of bacterial canker in kiwifruit. *Korean J Plant Pathol* **10**: 68-72.
- Koh, Y.J., Kim, G.H., Jung, J.S., Lee, Y.S., and Hur, J.S. (2010) Outbreak of bacterial canker on Hort16A (*Actinidia chinensis* Planchon) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea. *N Zea J Crop Hortic Sci* **38**: 275-282.

- Koh, Y.J., Kim, G.H., Koh, H.S., Lee, Y.S., Kim, S.-C., and Jung, J.S. (2012) Occurrence of a new type of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strain of bacterial canker on kiwifruit in Korea. *Plant Pathol J* **28**: 423-427.
- Kolos, A., and Banaszuk, P. (2013) Mowing as a tool for wet meadows restoration: Effect of long-term management on species richness and composition of sedge-dominated wetland. *Ecol Eng* **55**: 23-28.
- Krebs, J.R., Wilson, J.D., Bradbury, R.B., and Siriwardena, G.M. (1999) The second silent spring? *Nature* **400**: 611-612.
- Kruger, E., and Kuck, H.A. (1990) Einjaehrige Erfahrungen mit Alternativen zum Herbizideinsatz. *Obstbau* **15**: 200-206.
- Kuan, T.L., Minsavage, G.V., and Schaad, N.W. (1986) Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected *Brassica campestris*. *Plant Dis* **70**: 409-413.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A. et al. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Kuo, S., and Sainju, U.M. (1998) Nitrogen mineralization and availability of mixed leguminous and non-leguminous cover crop residues in soil. *Biol Ferti Soil* **26**: 346-353.
- Kuo, S., and Jellum, E.J. (2000) Long-term winter cover cropping effects on corn (*Zea mays* L.) production and soil nitrogen availability. *Biol Ferti Soil* **31**: 470-477.
- Lamichhane, J.R., Varvaro, L., Parisi, L., Audergon, J.-M., and Morris, C.E. (2014) Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: seeing the forest for the trees. *Adv Agro* **126**: 235-296.
- Langdale, G.W., and Leonard, R.A. (1983) Nutrient and sediment losses associated with conventional and reduced-tillage agricultural practices. In *Nutrient Cycling in Agricultural Ecosystems*. Lawrence, R.R. (ed). Athens: University of Georgia College of Agriculture, Special Publication No. 23, pp. 457-467.
- Lanini, W.T., McGourty, G.T., and Thrupp, L.A. (2011) Weed management for organic vineyards. In *Organic Winegrowing Manual*. McGourty, G. (ed). Richmond: University of California, Agriculture and Natural Resources, pp. 69-82.
- Latorre, B.A., and Jones, A.L. (1979a) Evaluation of weeds and plant refuse as potential sources of inoculum of *Pseudomonas syringae* in bacterial canker of cherry. *Phytopathol* **69**: 1122-1125.
- Latorre, B.A., and Jones, A.L. (1979b) *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan, and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathol* **69**: 335-339.
- Latorre, B.A., Gonzalez, J.A., Cox, J.E., and Vial, F. (1985) Isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cankers and effect of free moisture on its epiphytic populations on sweet cherry trees. *Plant Dis* **69**: 409-412.
- Leben, C. (1965) Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Ann Rev Phytopathol* **3**: 209-230.
- Lee, J.-H., Kim, J.-H., Kim, G.-H., Jung, J.-S., Hur, J.-S., and Koh, Y.-J. (2005) Comparative analysis of Korean and Japanese strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit. *Plant Pathol J* **21**: 119-126.
- Leger, R.G., and Millette, G.J. (1977) Properties of four Quebec soils after incubation with five species of earthworms. *Can J Soil Sci* **57**: 165-172.
- Li, M., Tan, G., Li, Y., Cheng, H., Han, X., Xue, L., and Li, L. (2004) Resistance of different Chinese gooseberry cultivars to Chinese gooseberry bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and their cluster analysis. *Plant Prot* **30**: 51-54.
- Liang, Y., Zhang, X., Tian, C., Gao, A., and Wang, P. (2000) Pathogenic identification of kiwifruit bacterial canker in Shaanxi. *J Nw Forest Coll* **15**: 37-39.
- Lindemann, J., and Upper, C.D. (1985) Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *App Env Microbiol* **50**: 1229-1232.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C., and Panopoulos, N.J. (1986) Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol* **168**: 512-522.
- Lindhard, H. (1992) Weed control in apples without herbicides. *Tidsskrift Planteavl* **2178**: 77-84.



- Lindow, S.E. (1982) Population dynamics of epiphytic ice nucleation active bacteria on frost sensitive plants and frost control by means of antagonistic bacteria. In *Plant cold hardiness and freezing stress - mechanisms and crop implications*, vol. 2. Li, P.H., and Sakai, A. (eds). New York: Academic Press, pp. 395-416.
- Lindow, S.E. (1986) Construction of isogenic Ice strains of *Pseudomonas syringae* for evaluation of specificity of competition on leaf surfaces. In *Perspectives in microbial ecology*. Slovene Society for Microbiology. Megusar, F., and Gantar, M. (eds). Ljubljana: Slovene Soc Microb, pp. 509-515.
- Lindow, S.E. (1988) Lack of correlation of in vitro antibiosis with antagonism of ice nucleation active bacteria on leaf surface by non-ice nucleation active bacteria. *Phytopathol* **78**: 444-450.
- Lindow, S.E. (1990) Design and results of field tests of recombinant Ice-*Pseudomonas syringae* strains. In *Risk assessment in agricultural biotechnology: proceedings of the International Conference*. Marois, J.J., and Bruening, G. (eds). California: University of California, pp. 61-69.
- Lindow, S.E. (1995) Control of epiphytic ice nucleation-active bacteria for management of plant frost injury. In *Biological ice nucleation and its applications*. Lee, R.E., Warren, G.J., and Gusta, L.V. (eds). St. Paul, Minn.: American Phytopathological Society, pp. 239-256.
- Lindow, S.E., and Brandl, M.T. (2003) Microbiology of the Phyllosphere. *App Env Microbiol* **69**: 1875-1883.
- Lipecki, J., and Szwedo, J. (1995) The effect of long-term use of herbicides and sward and various NPK fertilization on some chemical properties of the soil in the orchard. *Fol Horti* **7**: 3-9.
- Lipecki, J., and Berbec, S. (1997) Soil management in perennial crops: orchards and hop gardens. *Soil Till Res* **43**: 169-184.
- Liu, P., Xue, S., He, R., Hu, J., Wang, X., Jia, B. et al. (2016) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated from non-kiwifruit plant species in China. *Euro J Plant Pathol* **145**: 743-754.
- Lord, W.J. (1976) Dutch apple growing. *Compact Fruit Tree* **9**: 32-42.
- Luisetti, J., Gaignard, J.L., Vigouroux, A., Saunier, R., Lafuste, J.P., and Charras, J. (1992) Pêcher, le dépérissement bactérien. *Arboric Fruit* **447**: 19-28.
- Mabagala, R.B., and Saettler, A.W. (1992) The role of weeds in survival of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Northern Tanzania. *Plant Dis* **76**: 683-687.
- Maki, L.R., Galyan, E.L., Chang-Chien, M.-M., and Caldwell, D.R. (1974) Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *App Microbiol* **28**: 456-459.
- Malvick, D.K., and Moore, L.W. (1988) Population dynamics and diversity of *Pseudomonas syringae* on maple and pear trees and associated grasses. *Phytopathol* **78**: 1366-1370.
- Mantinger, H., and Gasser, H. (1987) Streissenbehandlungen in jungen Obstanlagen. *Obst Wein* **24**: 152-155.
- Mantinger, H., and Gasser, H. (1993) Weitere Erfahrungen mit unterschiedlicher Baumstreifenbehandlung in Obstjunganlagen. *Erwerbsobstbau* **35**: 188-193.
- Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., Firrao, G., and Scortichini, M. (2011) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genomes comparison reveal strain-specific features involved in adaptation and virulence to *Actinidia* species. *PLoS one* **6**: e27297.
- Mathee, F.N., and Erskine, J.V. (1971) Bacterial Canker of Stone Fruits. *Dec Fruit Grow* **21**: 204-206.
- McCarter, S.M., Jones, J.B., Gitaitis, R.D., and Smitley, D.R. (1983) Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue, and epiphytic weed hosts in Georgia. *Phytopathol* **73**: 1393-1398.
- McClure, M.S., Andreadis, T.G., and Lacy, G.H. (1982) Manipulating orchard ground cover to reduce invasion by leafhopper vectors of peach X-disease. *J Econ Entomol* **75**: 64-68.
- McGourty, G. (2004) Cover cropping systems for organically farmed vineyards. *Prac. Winery Vineyard* **Sept-Oct**: 1-7.
- McGourty, G.T., and Reganold, J.P. (2005) Managing vineyard soil organic matter with cover crops. In *Proceedings of the Soil Environment and Vine Mineral Nutrition Symposium*. Christensen, P. and Smart, D.R. (Eds.). Davis, CA.: American Society for Enology and Viticulture, pp. 145-151.
- Meagher, R.L., and Meyer, J.R. (1990a) Effects of ground cover management on certain abiotic and biotic interactions in peach orchard ecosystems. *Crop Prot* **9**: 65-72.

- Meagher, R.L., and Meyer, J.R. (1990b) Influence of ground cover and herbicide treatments on *Tetranychus urticae* populations in peach orchards. *Exp Appl Acarol* **9**: 149-158.
- Meheriuk, M., Neilsen, G.H., and Hogue, E.J. (1992) The influence of nitrogen fertilization, season of application, and orchard floor management on fruit quality and leaf mineral content of Golden Delicious apple trees. *Fruit Var J* **46**: 71-75.
- Merwin, I.A., Rosenberger, D.A., Engle, C.A., Rist, D.L., and Fargione, M. (1995) Comparing mulches, herbicides, and cultivation as orchard groundcover management systems. *HortTechnol* **5**: 151-158.
- Meyer, J.R., Zehr, E.I., Meagher, R.L., and Salvo, S.K. (1992) Survival and growth of peach trees and pest populations in orchard plots managed with experimental ground covers. *Agric Ecosys Env* **41**: 353-363.
- Mitsch, W.J. (2012) What is ecological engineering? *Ecol Eng* **45**: 5-12.
- Mohan, S.K., and Schaad, N.W. (1987) An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathol* **77**: 1390-1395.
- Momol, M.T., Olson, S.M., King, P., and Snell, J. (2002) Integrated management of tomato spotted wilt and bacterial spot on tomato. *N Flor Res Edu Cen Ext Rep* **7**: 10-11.
- Momol, M.T., Olson, S.M., Funderburk, J.E., Stavisky, J., and Marois, J.J. (2004) Integrated Management of Tomato Spotted Wilt on Field-Grown Tomatoes. *Plant Dis* **88**: 882-890.
- Monteil, C.L., Bardin, M., and Morris, C.E. (2014) Features of air masses associated with the deposition of *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by rain and snowfall. *ISME* **8**: 2290-2304.
- Monteil, C.L., Guilbaud, C., Glaux, C., Lafolie, F., Soubeyrand, S., and Morris, C.E. (2012) Emigration of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from leaf litter contributes to its population dynamics in alpine snowpack. *Env Microbiol* **14**: 2099-2112.
- Monteil, C.L., Lafolie, F., Laurent, J., Clement, J.-C., Simler, R., Travi, Y., and Morris, C.E. (2013a) Soil water flow is a source of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in subalpine headwaters. *Env Microbiol* **16**: 2038-2052.
- Monteil, C.L., Cai, R., Liu, H., Mechan Llontop, M.E., Leman, S., Studholme, D.J. *et al.* (2013b) Nonagricultural reservoirs contribute to emergence and evolution of *Pseudomonas syringae* crop pathogens. *New Phytol* **199**: 800-811.
- Morris, C.E., Monteil, C.L., and Berge, O. (2013) The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes. *Ann Rev Phytopathol* **51**: 85-104.
- Morris, C.E., Kinkel, L.L., Xiao, K., Prior, P., and Sands, D.C. (2007) Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Inf Gen Evol* **7**: 84-92.
- Morris, C.E., Sands, D.C., Vanneste, J.L., Montarry, J., Oakley, B., Guilbaud, C., and Glaux, C. (2010) Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. *MBio* **1**: e00107-00110.
- Morris, C.E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffiere, A. *et al.* (2008) The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J* **2**: 321-334.
- Morris, M.J., and Knox-Davies, P.S. (1980) *Raphanus raphanistrum* as a weed host of pathogens of cultivated cruciferae in the Western Cape Province of South Africa. *Phytophylactica* **12**: 53-55.
- Mulet, M., Lalucat, J., and Garcia-Valdes, E. (2010) DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Env Microbiol* **12**: 1513-1530.
- Nakajima, M., Masao, G., and Tadaaki, H. (2002) Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*. *J Gen Plant Pathol* **68**: 68-74.
- Neilsen, G.H., and Hogue, E.J. (1992) Long-term effects of orchard soil management on tree vigor and extractable soil nutrients. *Can J Soil Sci* **72**: 617-621.
- Nelson, M. (1944) Effect of the use of winter legumes on yields of cotton, corn, and rice. In *Bulletin (University of Arkansas. (Fayetteville campus). Agricultural Experiment Station), no. 451*. University of Arkansas, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station, 1944 (ed.). Fayetteville, Ark.
- Nemethy, J.B. (2004) Alternative soil management for sandy vineyards. *Acta Horti* **640**: 119-126.
- Niggli, U., Weibel, F.P., and Potter, C.A. (1989) Weed Control with Organic Mulches in Apple Orchards: Effects on Yield, Fruit Quality, and Dynamics of Nitrogen in Soil Solution. *Gartenbauwissenschaft* **54**: 224-232.

- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nuc Ac Res* **28**: e63-e63.
- Oliveira, M.T., and Merwin, I.A. (2001) Soil physical conditions in a New York orchard after eight years under different groundcover management systems. *Plant Soil* **234**: 233-237.
- Olmstead, M.A. (2006) *Cover crops as a floor management strategy for Pacific Northwest vineyards*. College of Agriculture, Human, and Natural Resources Sciences, Washington State University (ed.). Pullman.
- Panagopoulos, C.G. (1966) Studies on the source of inoculum for blast and black pit of Citrus. In *Proc. 1st Congr. Mediterr. Phytopathol.* Bari: Unione Fitopatologica Mediterranea, pp. 340-345.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P.K., Rao, P.V.L., and Morita, K. (2008) Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol* **18**: 407-421.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J., and Elphinstone, J. (2011) Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the *rpoD* locus. *Plant Pathol* **60**: 338-344.
- Pekar, S. (1999) Effect of IPM practices and conventional spraying on spider population dynamics in an apple orchard. *Agric Ecosys Env* **73**: 155-166.
- Perring, M.A. (1975) The effect of orchard factors on the chemical composition of apples IV. Some effects of soil management and NPK fertilizers. *J Hortic Sci* **50**: 425-433.
- Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y. *et al.* (2002) Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Nat Ac Sci* **99**: 7652-7657.
- Pfammatter, W. (1994) L'entretien du sol sur la ligne d'arbres fruitiers. *Rev Suisse Viti Arboric Hortic* **26**: 235-236.
- Pierson, E.A., Wood, D.W., Cannon, J.A., Blachere, F.M., and Pierson Iii, L.S. (1998) Interpopulation signaling via N-acyl-homoserine lactones among bacteria in the wheat rhizosphere. *Mol Plant Mic Interac* **11**: 1078-1084.
- Pinamonti, F. (1998) Compost mulch effects on soil fertility, nutritional status and performance of grapevine. *Nutr Cycl Agroecosys* **51**: 239-248.
- Polston, J.E., and Anderson, P.K. (1997) The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Dis* **81**: 1358-1369.
- Proebsting, E.L. (1970) Soil management in relation to fruit quality. *Proc 18th Int Hort Con* **4**: 223-239.
- Prokopy, R.J., Mason, J.L., Christie, M., and Wright, S.E. (1996) Arthropod pest and natural enemy abundance under second-level versus first-level integrated pest management practices in apple orchards: a 4-year study. *Agric Ecosys Env* **57**: 35-47.
- Prunier, J.P., Bonnat, R., Cotta, J., and Pelissier, A. (1985) Le chancre bactérien du Cerisier en France. La lutte chimique contre *Pseudomonas morsprunorum*. *Arboric Fruit* **376**: 47-50.
- Psotova, J., Kolar, M., Sousek, J., Svagera, Z., Vicar, J., and Ulrichova, J. (2003) Biological activities of *Prunella vulgaris* extract. *Phytother Res* **17**: 1082-1087.
- Quigley, N.B., and Gross, D.C. (1994) Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the *syrB* and *syrD* genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. *Mol Plant Mic Interac* **7**: 78-78.
- Raimbault, B.A., Vyn, T.J., and Tollenaar, M. (1990) Corn response to rye cover crop management and spring tillage systems. *Agro J* **82**: 1088-1093.
- Raw, F. (1967) Arthropods (except Acari and Collembola). In *Soil Biology*. Burges, N., and Raw, F. (eds). London: Academic Press, pp. 323-362.
- Reeves, D.W., Wood, C.W., and Touchton, J.T. (1993) Timing nitrogen applications for corn in a winter legume conservation-tillage system. *Agro J* **85**: 98-106.
- Rivera-Vargas, L., Acosta, V.B., Beaver, J.S., Polston, J.E., and Hiebert, E. (2002) Detection of bean golden yellow mosaic virus in breeding lines and the common legume weed, *Macroptilium lathyroides*. *Puerto Rico. J. Agric. Univ. PR* **85**: 165-176.
- Rodriguez-Lovelle, B., Soyer, J.P., and Molot, C. (2000) Nitrogen availability in vineyard soils according to soil management practices. Effects on vine. *Acta Hortic* **256**: 277-286.

- Roine, E., Raineri, D.M., Romantschuk, M., Wilson, M., and Nunn, D.N. (1998) Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant Mic Interac* **11**: 1048-1056.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiho-Lassila, E.-L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., and He, S.Y. (1997) Hrp pilus: an *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Nat Ac Sci* **94**: 3459-3464.
- Roos, I.M.M., and Hattingh, M.J. (1983) Scanning Electron Microscopy of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on Sweet Cherry Leaves. *J Phytopathol* **108**: 18-25.
- Roos, I.M.M., and Hattingh, M.J. (1986a) Pathogenic *Pseudomonas* spp. in stone fruit buds. *Phytophylactica* **18**: 7-9.
- Roos, I.M.M., and Hattingh, M.J. (1986b) Weeds in orchards as potential source of inoculum for bacterial canker of stone fruit. *Phytophylactica* **18**: 5-6.
- Rovira, A.D., and Greacen, E.L. (1957) The effect of aggregate disruption on the activity of microorganisms in the soil. *Crop Past Sci* **8**: 659-673.
- Rueger, H. (1991) Versuche zur Einsparung von Herbiziden im Obstbau. *Obstbau* **16**: 346-350.
- Ruinelli, M., Schneeberger, P. H. H., Ferrante, P., Bühlmann, A., Scortichini, M., Vanneste, J. L., Duffy, B., and Pothier, J. F. (2016). Comparative genomics-informed design of two LAMP assays for detection of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and discrimination of isolates belonging to the pandemic biovar 3. *Plant Pathol* **66**: 140-149.
- Russell, E.J. (1915) *Soil conditions and plant growth*. London: Longmans, Green and Company.
- Russell, E.W. (1971) Soil structure: its maintenance and improvement. *J Soil Sci* **22**: 137-151.
- Ruttimann, M.A. (2001) Boden-, Herbizid-, und Nährstoffverluste durch Abschwemmung bei konservierender Bodenbearbeitung und Mulchsaat von Silomais. *Physiogeographika* **30**: 1-238.
- Salati, R., Nahkla, M.K., Rojas, M.R., Guzman, P., Jaquez, J., Maxwell, D.P., and Gilbertson, R.L. (2002) Tomato yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathol* **92**: 487-496.
- Sanchez, E.E., Giayetto, A., Cichon, L., Fernandez, D., Aruani, M.C., and Curetti, M. (2007) Cover crops influence soil properties and tree performance in an organic apple (*Malus domestica* Borkh) orchard in northern Patagonia. *Plant Soil* **292**: 193-203.
- Sanguaneko, P.P., and Leon, R.G. (2011) Weed management practices determine plant and arthropod diversity and seed predation in vineyards. *Weed Res* **51**: 404-412.
- Sarrantonio, M., and Scott, T.W. (1988) Tillage effects on availability of nitrogen to corn following a winter green manure crop. *Soil Sci Soc Am J* **52**: 1661-1668.
- Satchell, J.E. (1967) Lumbricidae. In *Soil biology*. Burges, N.A., and Raw, F. (eds). London: Academic Press, pp. 259-322.
- Sarac, N., and Ugur, A. (2007) Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsian J BioSci* **4**: 28-37.
- Sauphanor, B., Dirwimmer, C., Boutin, S., Chaussabel, A.L., Dupont, N., Fauriel, J. et al. (2009) Analyse comparative de différents systèmes en arboriculture fruitière. In *Ecophyto R&D: vers des systèmes de culture économes en produits phytosanitaires, Rapport d'Expertise Collective Inra*. Inra (ed).
- Sauvage, D. (1995) La lutte contre l'érosion grâce aux mulchs. Interêt et limites. *Phytoma* **478**: 43-46.
- Sawada, H., Miyoshi, T., and Ide, Y. (2014) Novel MLSA group (Psa5) of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in Japan. *Jap J Phytopathol* **80**: 171-184.
- Schaad, N.W., and Dianese, J.C. (1981) Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathol* **71**: 1215-1220.
- Scortichini, M. (1994) Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathol* **43**: 1035-1038.
- Scortichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., and Firrao, G. (2013) A genomic redefinition of *Pseudomonas avellanae* species. *PLoS one* **8**: e75794.
- Scortichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., and Firrao, G. (2012) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Mol Plant Pathol* **13**: 631-640.

- Serizawa, S., and Ichikawa, T. (1993a) Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 4. Optimum temperature for disease development on new canes. *Jap J Phytopathol* **59**: 694-701.
- Serizawa, S., and Ichikawa, T. (1993b) Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit, 3: The seasonal changes of bacterial population in lesions and of its exudation from lesion. *Jap J Phytopathol* **59**: 469-476.
- Serizawa, S., and Ichikawa, T. (1993c) Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit, 1: Infection and bacterial movement in tissue of new canes. *Jap J Phytopathol* **59**: 452-459.
- Serizawa, S., Ichikawa, T., and Suzuki, H. (1994) Epidemiology of bacterial canker of kiwifruit. 5. Effect of infection in fall to early winter on the disease development in branches and trunk after winter. *Jap J Phytopathol* **60**: 237-244.
- Serizawa, S., Ichikawa, T., Takikawa, Y., Tsuyumu, S., and Goto, M. (1989) Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan: Description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides. *Jap J Phytopathol* **55**: 427-436.
- Shapland, E.B., Daane, K.M., Yokota, G.Y., Wistrom, C., Connell, J.H., Duncan, R.A., and Viveros, M.A. (2006) Ground vegetation survey for *Xylella fastidiosa* in California almond orchards. *Plant Dis* **90**: 905-909.
- Shear, G.M., and Moschler, W.W. (1969) Continuous corn by the no-tillage and conventional tillage methods: A six-year comparison. *Agro J* **61**: 524-526.
- Shim, H.H., Koh, Y.J., Jae-Seoun, H. and Jung, J.S. (2003) Identification and characterization of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *J Microbiol Biotechnol* **13**: 110-118.
- Shrestha, A., Moretti, M., and Mourad, N. (2012) Evaluation of thermal implements and organic herbicides for weed control in a nonbearing almond (*Prunus dulcis*) orchard. *Weed Technol* **26**: 110-116.
- Shrestha, A., Hanson, B.D., Fidelibus, M.W., and Alcorta, M. (2010) Growth, phenology, and intraspecific competition between glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible horseweeds (*Conyza canadensis*) in the San Joaquin Valley of California. *Weed Sci* **58**: 147-153.
- Shrestha, A., Kurtural, S.K., Fidelibus, M.W., Dervishian, G., and Konduru, S. (2013) Efficacy and cost of cultivators, steam, or an organic herbicide for weed control in organic vineyards in the San Joaquin Valley of California. *HortTechnol* **23**: 99-108.
- Sicher, L., Dorigoni, A., and Stringari, G. (1993) Soil management effects on nutritional status and grapevine performance. *Acta Hortic* **383**: 73-82.
- Simon, S., Bouvier, J.-C., Debras, J.-F., and Sauphanor, B. (2010) Biodiversity and pest management in orchard systems. A review. *Agron Sustain Dev* **30**: 139-152.
- Singh, S., Koehler, B., and Fett, W.F. (1992) Effect of osmolarity and dehydration on alginate production by fluorescent pseudomonads. *Curr Microbiol* **25**: 335-339.
- Smith, R., Bettiga, L., Baumgartner, K., Jackson, L., and Bensen, T. (2008) Vineyard floor management affects soil, plant nutrition, and grape yield and quality. *Cal Agric* **62**: 184-190.
- Sobiczewski, P. (1987) Antagonistic bacteria in relation to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* occurring in necroses and cankers of sour cherry trees. *Fruit Sci Rep* **14**: 179-185.
- Sobiczewski, P., and Jones, A.L. (1992) Effect of exposure to freezing temperatures on necrosis in sweet cherry shoots inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* or *P. s. morsprunorum*. *Plant Dis* **76**: 447-451.
- Sobiczewski, P., Chiou, C.S., and Jones, A.L. (1991) Streptomycin-resistant epiphytic bacteria with homologous DNA for streptomycin resistance in Michigan apple orchards. *Plant Dis* **75**: 1110-1113.
- Spinelli, F., Donati, I., Vanneste, J.L., Costa, M., and Costa, G. (2011) Real time monitoring of the interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *Actinidia species*. *Acta Hortic*. **913**: 461-465.
- Spinelli, F., Donati, I., Cellini, A., Buriani, G., Fiorentini, L., Rocchi, L. et al. (2013a) Pollen-mediated dispersion of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. In *Proceedings of 1st International Symposium on Bacterial Canker of Kiwifruit (Psa)*. Mt. Maunganui New Zealand.
- Spinelli, F., Donati, I., Cellini, A., Buriani, G., Vanneste, J.L., Yu, J. et al. (2013b) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* colonization of kiwifruit flowers and methods to prevent infection. In *Proceedings of 1st International Symposium on Bacterial Canker of Kiwifruit (Psa)*. Mt. Maunganui New Zealand.

- Spring, J.L. (1993) Essai d'entretien du sol sur la ligne d'arbres: résultats intermédiaires. *Rev Suisse Vitic Arboric Hortic* **25**: 353-361.
- Stasiak, M.J. (1990) The influence of a subterranean clover ground cover on the growth and nutrient status of young peach trees. *Proc Ann Meet Ark St Hort Soc* **110**: 176-181.
- Steenwerth, K.L., and Belina, K.M. (2010) Vineyard weed management practices influence nitrate leaching and nitrous oxide emissions. *Agric Ecosys Env* **138**: 127-131.
- Stefani, E., and Giovanardi, D. (2011) Dissemination of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through pollen and its epiphytic life on leaves and fruits. *Phytopathol Med* **50**: 489-496.
- Stevenson, I.L., and Chase, F.E. (1953) Nitrification in an orchard soil under three cultural practices. *Soil Sci* **76**: 107-114.
- Stott, K.G. (1976) The effects of competition from ground covers on apple vigour and yield. *Ann Appl Biol* **83**: 327-330.
- Sundin, G.W. (2002a) Distinct recent lineages of the *strA-strB* streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria. *Curr Microbiol* **45**: 63-69.
- Sundin, G.W. (2002b) Ultraviolet radiation on leaves: its influence on microbial communities and their adaptations. In *Phyllosphere microbiology*. Lindow, S.E., Hecht-Poinar, E.I., and Elliott, V.J. (eds). St. Paul, Minn.: American Phytopathological Society, pp. 27-41.
- Sundin, G.W., and Bender, C.L. (1996) Molecular Analysis of Closely Related Copper-and Streptomycin-Resistance Plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plasmid* **35**: 98-107.
- Sundin, G.W., Jones, A.L., and Olson, B.D. (1988) Overwintering and population dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Ps* pv. *morsprunorum* on sweet and sour cherry trees. *Can J Plant Pathol* **10**: 281-288.
- Sutic, D.D., Ford, R.E., and Tomic, M.T. (1999) *Handbook of plant virus diseases*. Sutic, D.D., Ford, R.E., and Tomic, M.T. (eds.). Boca Raton: CRC Press.
- Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S., and Goto, M. (1989) *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Jap J Phytopathol* **55**: 437-444.
- Teasdale, J.R., and Mohler, C.L. (1993) Light transmittance, soil temperature, and soil moisture under residue of hairy vetch and rye. *Agro J* **85**: 673-680.
- Teasdale, J.R., and Shirley, D.W. (1998) Influence of herbicide application timing on corn production in a hairy vetch cover crop. *J Prod Agric* **11**: 121-125.
- Thakur, G.C., Chadha, T.R., Verma, H.S., and Kumar, J. (1993) Effect of soil management systems on bearing and fruit quality of apple cv. Red Delicious. *Ind J Hortic* **50**: 10-13.
- Thomson, L.J., and Hoffmann, A.A. (2007) Effects of ground cover (straw and compost) on the abundance of natural enemies and soil macro invertebrates in vineyards. *Agric Forest Entomol* **9**: 173-179.
- Thresh, J.M. (1981) The role of weeds and wild plants in the epidemiology of plant virus diseases. In *Pests Pathogens and Vegetation*. Thresh, J.M. (ed). London: Pitman Books, pp. 53-70.
- Tisdall, J.M. (1978) Ecology of earthworms in irrigated orchards. In *Modification of soil structure*. Emerson, W.W., Bond, R.D., and Dexter, A.R. (eds). Chichester: John Wiley and Sons, pp. 197-303.
- Tourte, L., Smith, R., Bettiga, L., Bensen, T., Smith, J., and Salm, D. (2008) Post-emergence herbicides are cost effective for vineyard floor management on the Central Coast. *Cal Agric* **62**: 19-23.
- Toussaint, V., Benoit, D.L., and Carisse, O. (2012) Potential of weed species to serve as a reservoir for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. *Crop Prot* **41**: 64-70.
- Triplett, G.B., and Van Doren, D.M. (1969) Nitrogen, phosphorus, and potassium fertilization of non-tilled maize. *Agro J* **61**: 637-639.
- Tu, X., Shen, Z., Gao, Z.P., Kang, Z.S., and Huang, L.L. (2011) Investigation of Kiwifruit Bacterial Canker Disease (*Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* Takikawa) in Guanzhong Area of Shanxi Province and Its Biological Control. *Plant Dis Pest* **2**: 17-20.
- Tyson, J.L., Rees-George, J., Curtis, C.L., Manning, M.A., and Fullerton, R.A. (2012) Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on the orchard floor over winter. *New Zea Plant Prot* **65**: 25-28.
- Vali, G. (1995) Principles of ice nucleation. In *Biological ice nucleation and its applications*. Lee, R.E., Warren, G.J., and Gusta, L.V. (eds). St. Paul, Minn.: American Phytopathological Society, pp. 1-28.

- Van Emden, H.F., and Williams, G.F. (1974) Insect stability and diversity in agro-ecosystems. *Annu Rev Entomol* **19**: 455-475.
- Van Gijsegem, F.d.r., Vasse, J., Camus, J.C., Marendra, M., and Boucher, C. (2000) *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol Microbiol* **36**: 249-260.
- Van Schreven, D.A., Lindenbergh, D.J., and Koridon, A. (1970) Effect of several herbicides on bacterial populations and activity and the persistence of these herbicides in soil. *Plant Soil* **33**: 513-532.
- Vanneste, J.L., Voyle, M.D., and Zydenbos, S.M. (2003) Genetic basis of copper resistance in New Zealand strains of *Pseudomonas syringae*. *New Zea Plant Prot* **56**: 109-112.
- Vanneste, J.L., Moffat, B.J., and Oldham, J.M. (2012) Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on *Cryptomeria japonica*, a non-host plant used as shelter belts in kiwifruit orchards. *New Zea Plant Prot* **65**: 1-7.
- Vanneste, J.L., Yu, J., Cornish, D.A., Max, S., and Clark, G. (2011a) Presence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, on symptomatic and asymptomatic tissues of kiwifruit. *New Zea Plant Prot* **64**: 241-245.
- Vanneste, J.L., Onorato, R., Yu, J., Cornish, D.A., Spinelli, F., Max, S., and Kay, C. (2010) Recent advances in the characterization and control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker on kiwifruit. *Acta Hort* **913**: 443-455.
- Vanneste, J.L., Giovanardi, D., Yu, J., Cornish, D.A., Kay, C., Spinelli, F., and Stefani, E. (2011b) Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit pollen samples. *New Zea Plant Prot* **64**: 246-251.
- Vanneste, J.L., Poliakoff, F., Audusseau, C., Cornish, D.A., Paillard, S., Rivoal, C., and Yu, J. (2011c) First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in France. *Plant Dis* **95**: 1311-1311.
- Varga, P., and Majer, J. (2003) The use of organic wastes for soil-covering of vineyards. *Acta Hort* **652**: 191-197.
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.F., Jacques, M.-A., Lebrun, M.-H. *et al.* (2014) Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front Cell Infect Microbiol* **4**.
- Vigouroux, A. (1989) Ingress and spread of *Pseudomonas* in stems of peach and apricot promoted by frost-related water-soaking of tissues. *Plant Dis* **73**: 854-855.
- Vigouroux, A. (1999) Bacterial canker of peach: effect of tree winter water content on the spread of infection through frost-related water soaking in stems. *J Phytopathol* **147**: 553-559.
- Vukicevich, E., Lowery, T., Bowen, P., Urbez-Torres, J.R., and Hart, M. (2016) Cover crops to increase soil microbial diversity and mitigate decline in perennial agriculture. A review. *Agron Sustain Dev* **36**: 1-14.
- Waissbluth, I.M.M., and Latorre, B.A. (1978) Source and seasonal development of inoculum for pear blast in Chile. *Plant Dis Rep* **62**: 651-655.
- Wallwork, J.A. (1970) *Ecology of soil animals*. London: McGraw-Hill.
- Wallwork, J.A. (1976) *The distribution and diversity of soil fauna*. London: Academic Press.
- Wan, N.-F., Ji, X.-Y., Gu, X.-J., Jiang, J.-X., Wu, J.-H., and Li, B. (2014) Ecological engineering of ground cover vegetation promotes biocontrol services in peach orchards. *Ecol Eng* **64**: 62-65.
- Wang, Z., Tang, X., and Liu, S. (1992) Identification of the pathogenic bacterium for bacterial canker on *Actinidia* in Sichuan. *Journal of Southwest Agricultural University*. Available at [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-XNND199206007.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-XNND199206007.htm) [accessed on August 26, 2016].
- Warnick, J.P., Chase, C.A., Roskopf, E.N., Simonne, E.H., Scholberg, J.M., Koenig, R.L., and Roe, N.E. (2006) Weed suppression with hydramulch, a biodegradable liquid paper mulch in development. *Renew Agric Food Sys* **21**: 216-223.
- Warren, G., and Corotto, L. (1989) The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae*. *Gene* **85**: 239-242.
- Warren, G., Corotto, L., and Wolber, P. (1986) Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. *Nuc Ac Res* **14**: 8047-8060.
- Warwick, S.I. (1991) Herbicide resistance in weedy plants: physiology and population biology. *Ann Rev Ecol Sys* **22**: 95-114.

- Weaver, D.J. (1978) Interaction of *Pseudomonas syringae* and freezing in bacterial canker on excised peach twigs. *Phytopathol* **68**: 1460-1463.
- Webber, J.F., and Gee, C.M. (1994) Wood chips as a mulch or soil amendment. *Arboric Res Info No Dep Env* **123**.
- Westgard, P.H., Flexner, L.J., Vanburskirk, P., Gonzalves, P., and Hilton, R. (1990) Dispersal pattern of the twospotted spider mite from orchard groundcover into pear. *Bull. SROP* **13**: 53-57.
- Will, H. (1962) Auswirkungen unterschiedlicher Bodenpflegemaßnahmen im Obstbau. *Erwerbsobstbau* **4**: 44-46.
- Wisler, G.C., and Norris, R.F. (2005) Interactions between weeds and cultivated plants as related to management of plant pathogens. *Weed Sci* **53**: 914-917.
- Wisler, G.C., Duffus, J.E., Liu, H.Y., and Li, R.H. (1998) Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. *Plant Dis* **82**: 270-280.
- Wolber, P.K., and Warren, G.J. (1991) Evolutionary Perspective on the Ice Nucleation Gene-Encoded Membrane Protein. In *Microbial Ecology of Leaves*. Andrews, J.H., and Hirano, S.S. (eds). New York, NY: Springer New York, pp. 315-330.
- Wyss, E. (1996) The effects of artificial weed strips on diversity and abundance of the arthropod fauna in a Swiss experimental apple orchard. *Agric Ecosys Env* **60**: 47-59.
- Young, J.M. (1978) Survival of bacteria on *Prunus* leaves. *Proc 4th Int Conf Plant Patho Bact* **2**: 779-786.
- Young, J.M. (1991) Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Ann Appl Biol* **118**: 283-298.
- Young, J.M. (2010) Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *J Plant Pathol* **92**: S1.5-S1.14.
- Young, J.M., Dye, D.W., Bradbury, J.F., Panagopoulos, C.G., and Robbs, C.F. (1978) A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zea J Agric Res* **21**: 153-177.
- Yu, J., Penalzoza-Vazquez, A., Chakrabarty, A.M., and Bender, C.L. (1999) Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Microbiol* **33**: 712-720.
- Zebarth, B.J., Freyman, S., and Kowalenko, C.G. (1993) Effect of ground covers and tillage between raspberry rows on selected soil physical and chemical parameters and crop response. *Can J soil Sci* **73**: 481-488.
- Zhao, J.-I., and Orser, C.S. (1990) Conserved repetition in the ice nucleation gene *inaX* from *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Mol Gen Gen MGG* **223**: 163-166.
- Zhao, L.N., Hu, J.Y., Ye, Z.F., Liu, P., and Zhu, L.W. (2012) Molecular identification and pathogenicity detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*. *J Hu Agric Univ* **31**: 604-608.
- Zhao, Z.B., Gao, X.N., Huang, Q.L., Huang, L.L., Qin, H.Q., and Kang, Z.S. (2013) Identification and characterization of the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in the Shaanxi province of China. *J Plant Pathol* **95**: 155-162.
- Zhu, X.X., Fang, Y.Z., and Liao, X.G. (1993) Identification of pathogen of bacterial canker on kiwifruit. *Hu Agric Sci* **6**: 31-33.