



HAL
open science

**L'étude de la pathologie de *Xanthomonas campestris* et
de la structure génétique de ses pathovars a permis
l'amélioration de la détection du pathogène dans les
semences de Brassicacées**

Emilie Fargier

► **To cite this version:**

Emilie Fargier. L'étude de la pathologie de *Xanthomonas campestris* et de la structure génétique de ses pathovars a permis l'amélioration de la détection du pathogène dans les semences de Brassicacées. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2007. Français. NNT : . tel-00345821

HAL Id: tel-00345821

<https://theses.hal.science/tel-00345821>

Submitted on 10 Dec 2008

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.

L'étude de la pathologie de *Xanthomonas campestris* et de la structure génétique de ses pathovars a permis l'amélioration de la détection du pathogène dans les semences de Brassicacées

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Microbiologie

ÉCOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

Le 29 mai 2007

À Angers

Par **Émilie FARGIER**

Rapporteurs : Xavier NESME, Ingénieur de Recherche, INRA, Lyon
Olivier PRUVOST, Chargé de Recherche, CIRAD, La Réunion

Examineurs : Philippe SIMONEAU, Professeur, Université d'Angers
Valérie GRIMAULT, Responsable du laboratoire de Pathologie GEVES/SNES, Angers

Directeur de thèse : Charles MANCEAU, Ingénieur de Recherche, INRA, Angers

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Charles Manceau, pour l'attention et l'aide qu'il a porté à mon travail de doctorante, je lui suis particulièrement reconnaissante pour la confiance et l'amitié qu'il m'a accordée.

J'exprime mes remerciements à Xavier Nesme et Olivier Pruvost qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie vivement Philippe Simoneau et Valérie Grimault qui ont bien voulu accepter d'être les examinateurs de cette thèse.

J'adresse mes remerciements à mes financeurs : le GEVES et la Région Pays de la Loire. Un grand merci à mes collègues de la SNES-GEVES — Cécile Collonnier, Valérie Grimault, René Mathis et Valérie Olivier — pour leur disponibilité, leurs conseils précieux et leur collaboration durant cette thèse.

J'exprime toute mon amitié à Martine Devaux, Jacky Guillaumes, Bruno Le Cam, Elisabeth De Lomenie, Pierre Gladieux, Arnaud Darsonval, Damien Meyer et Bérénice Briand ; merci à vous pour vos conseils, votre soutien, votre aide quotidienne et votre amitié.

Un grand merci également à Marion Fischer-Le Saux et Marie-Agnès Jacques pour le temps que vous avez consacré à la relecture de ce travail, pour vos conseils très précieux et pour votre amitié.

Mes remerciements s'adressent ensuite à tous mes collègues de l'UMR PaVé dont l'aide et le soutien m'ont été précieux au cours de mon travail, en

particulier Martial Briand, Solange Belouin, Joël Benard, Sophie Bonneau, Chrystelle Brin, Marie-Noëlle Brisset, Christine Bureau, Tristan Boureau, Sophie Cesbron, Roland Chartier, Armelle Darrasse, Elisabeth Dineau, Thomas Duge De Bernonville, Karine Durand, Jacqueline Gaudin, Cristelle Heintz, Paul Horeau, Alain Huard, Chantale Lesseure, Jean-Pierre Paulin, Isabelle Pontais, Stéphane Poussier et Natalia Sapoukhina.

Merci à tous mes amis qui ont beaucoup compté durant cette thèse : Audrey, Clémentine, Clothilde, Daphné, Didier, Émilie, Gyasi, Hélène, Jean Fred, Laurent, Ludovic, Magali, Marie-Aude, Olivier, Sébastien, Sophie, Thomas, Tony et Vincent.

Merci du fond du cœur à toi, Adrien, pour la bulle de bonheur que tu sais construire chaque jour autour de nous. Je remercie également ses parents pour leur soutien, leur amitié et leur gentillesse.

Merci à vous ma famille, mes parents adorés, ma sœur chérie, merci pour votre soutien sans faille, vos encouragements et votre amour, vous êtes ma force.

Je dédie cette thèse à ma grand-mère Cécile Le Botland,

Table des matières

I	Introduction générale	11
1	Situation des <i>Xanthomonas</i> dans la taxonomie des bactéries	13
1.1	Une vue générale de la taxonomie bactérienne	13
1.1.1	La taxonomie phénotypique	15
1.1.2	La taxonomie moléculaire	16
1.1.3	La taxonomie évolutive	17
1.1.4	La taxonomie polyphasique	18
1.1.5	La classification des bactéries	20
1.2	La définition des groupes taxonomiques du genre et de l'espèce	20
1.2.1	La nomenclature des bactéries	20
1.2.2	L'espèce bactérienne	24
1.2.3	Le genre bactérien	26
1.3	La taxonomie du genre <i>Xanthomonas</i>	27
1.3.1	Quelques généralités sur les bactéries phytopathogènes	27
1.3.2	Une taxonomie basée sur le pouvoir pathogène	30
1.3.3	La taxonomie moléculaire et évolutive du genre <i>Xanthomonas</i>	33
1.3.4	Une grande polémique autour de la nomenclature des <i>Xanthomonas</i>	39
2	L'hôte et son pathogène : les Brassicacées et <i>X. campestris</i>	45
2.1	Les Brassicacées	45

TABLE DES MATIÈRES

2.1.1	L'importance économique des Brassicacées	45
2.2	Origine et botanique de certaines Brassicacées	49
2.2.1	Une grande plasticité génétique à l'origine de la diversité de cette famille	49
2.2.2	Le centre d'origine et de diversification de certaines Brassicacées cultivées	51
2.3	Les caractéristiques générales	55
2.3.1	L'appareil végétatif	55
2.3.2	Les fleurs : l'appareil reproducteur	55
2.3.3	Les fruits	56
2.4	Les maladies et ravageurs des Brassicacées	57
2.4.1	Les ravageurs et les maladies fongiques des Brassicacées cultivées	57
2.4.2	Les maladies bactériennes des Brassicacées cultivées	59
2.5	Les bactérioses des Brassicacées causées par des <i>X. campestris</i>	61
2.5.1	Les six maladies provoquées par <i>X. campestris</i>	61
2.6	Les caractéristiques cellulaires des <i>Xanthomonas</i>	65
2.6.1	La morphologie de la bactérie	65
2.6.2	La classification intraspécifique des <i>X. campestris</i>	71
2.6.3	Le cycle infectieux de <i>X. campestris</i> (figure 2.19)	74
2.7	Les moyens de lutte contre les <i>X. campestris</i>	78
2.7.1	Les mesures prophylactiques	78
2.7.2	L'utilisation de produits chimiques	79
2.7.3	La culture de variétés résistantes ou tolérantes	80
2.7.4	La Lutte biologique contre <i>X. campestris</i>	80
2.7.5	Le contrôle sanitaire des semences	81

Objectifs du travail

83

II	Résultats	85
3	Étude de la diversité pathologique des <i>X. campestris</i>	87
	Contexte scientifique	87
	Pathogenicity assays restrict the <i>Xanthomonas campestris</i> species (Vauterin <i>et al.</i> , 1995) into three pathovars and reveal nine races within <i>X. c. pv. campestris</i> . . .	91
3.1	Introduction	92
3.2	Materials and methods	96
3.2.1	Bacterial strains	96
3.2.2	DNA preparation and PCR amplification	96
3.2.3	Plant material and plant inoculations	97
3.3	Results	99
3.3.1	Identification of <i>X. campestris</i>	99
3.3.2	Pathogenicity determination of <i>X. campestris</i> strains .	100
3.3.3	Race determination within <i>X. c. pv. campestris</i>	106
3.3.4	Race determination within <i>X. c. pv. raphani</i>	107
3.4	Discussion	109
3.4.1	Identification of <i>X. campestris</i> by PCR	109
3.4.2	Identification of pathovars	110
3.4.3	Nine races of <i>X. c. pv. campestris</i> and three races of <i>X. c. pv. raphani</i> displayed differential responses on Brassica cultivars.	114
4	Étude de la diversité génétique de l'espèce <i>X. campestris</i>	119
	Contexte scientifique	119
	Recombination and point mutation contribute to the high genetic diversity of <i>X. campestris</i> (Vauterin <i>et</i> <i>al.</i> , 1995) and to the complex structure of pathovars .	124
4.1	Introduction	124
4.2	Materials and methods	127

4.2.1	Bacterial strains	127
4.2.2	DNA isolation and sequencing	127
4.2.3	Phylogenetic analysis	130
4.2.4	MLST analysis	132
4.3	Results	133
4.3.1	Phylogenetic analyses	133
4.3.2	MLST analyses	141
4.3.3	Assessment of recombination rate within <i>X. campestris</i> species	144
4.4	Discussion	148
4.4.1	Genetic cohesion of <i>X. campestris</i> species	148
4.4.2	Pathovars are complex genetic structures	149
4.4.3	Evidence of intraspecies recombination within <i>X. cam- pestris</i>	151
	Données complémentaires	154
	Application de la MLSA pour définir les espèces au sein du genre <i>Xanthomonas</i>	154
5	Détection des <i>X. campestris</i> dans les semences de Brassicacées	165
	Contexte scientifique	165
	Detection of living cells of <i>X. campestris</i> pathogenic on crucifers in seeds by BIO-PCR	170
5.1	Introduction	170
5.2	Materials and methods	172
5.2.1	Bacterial strains	172
5.2.2	Seed lots	172
5.2.3	Seed washing	172
5.2.4	Media	173
5.2.5	Plant material and plant inoculations	173
5.2.6	Susceptibility to antibiotics/ Antimicrobial agents . . .	173
5.2.7	Growth curves in semi selective broths	174

TABLE DES MATIÈRES

5.2.8	DNA preparation and PCR amplification	174
5.2.9	Specificity and sensitivity of primers	175
5.2.10	BIO-PCR	176
5.3	Results	176
5.3.1	Antibiotic susceptibility of <i>X. campestris</i>	176
5.3.2	Bacterial growth assessment in antibiotic supplemented broths.	181
5.3.3	Comparative efficiency of semi selective media proposed to detect <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> in crucifer seeds	181
5.3.4	Selectivity of the YPACvc medium for the crucifer seed microflora	183
5.3.5	Specificity and detection limits of primers	184
5.3.6	Assessment of YPCvc broth and YPACvc medium as enrichment medium used in the scheme of a BIO-PCR assay	185
5.3.7	Comparison between reference method (Roberts and Koenraad, 2006) and the YPACvc / BIO-PCR method for the detection of <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> in naturally infected crucifer seeds	185
5.4	Discussion	186
	Données complémentaires	190
	Évaluation de la durée de vie de cellules mortes dans du macérat de graine de chou	190
	Mise au point d'une nouvelle technique d'enrichisse- ment des bactéries dans les semences : La SEED-PCR .	192
	Conclusions générales et perspectives	195
	Bibliographie	203
	Résumé / Abstract	236

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Situation des *Xanthomonas* dans la taxonomie des bactéries

1.1 Une vue générale de la taxonomie bactérienne

Ordonner et grouper les objets est une préoccupation ancestrale de l'Homme. En biologie, cette préoccupation est une science, la taxonomie, dont l'objectif est de décrire les organismes vivants, de les regrouper en entités appelées taxons afin de pouvoir les nommer et les classer. Le terme fut utilisé pour la première fois en 1813, sous l'orthographe de " taxonomie ", par le botaniste suisse Augustin Pyrame de Candolle dans ses travaux sur la classification des végétaux. La taxonomie regroupe trois disciplines : 1) la classification, l'arrangement des unités taxonomiques dans des groupes ; 2) la nomenclature, l'assignement de noms aux unités taxonomiques (en bactériologie, elle suit le code international de nomenclature bactérienne (Lapage, 1992) ; et enfin 3) l'identification, le moyen par lequel un organisme inconnu est assigné à un groupe taxonomique connu (Cowan, 1968) (Figure 1.1).

La taxonomie (du grec *taxis*, « placement », « mise en ordre », et *nomos*,

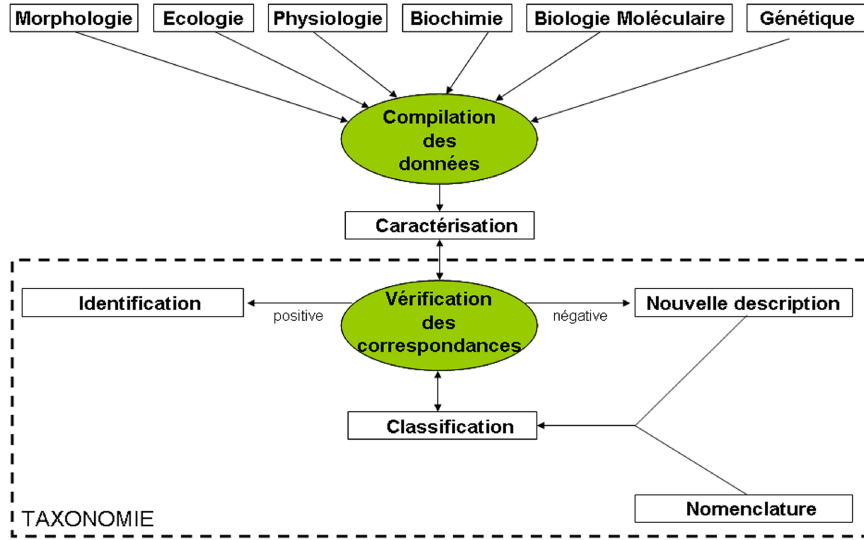


FIG. 1.1 – Schéma explicatif de la Taxonomie.

Il indique les relations entre la caractérisation et la classification des souches bactériennes. Deux étapes importantes (indiquées par les bulles vertes) sont les compilations des différentes propriétés et la vérification de la correspondance entre caractérisation et classification (Truper, 2001).



FIG. 1.2 – Antony van Leeuwenhoek découvrit les bactéries en voulant fabriquer de meilleures lentilles afin de juger de la qualité des tissus qu'il achetait.

« loi ») a évolué au cours des siècles parallèlement à notre connaissance du vivant. Les améliorations de la taxonomie des procaryotes seront développées dans ce chapitre avec une attention particulière pour la taxonomie des bactéries phytopathogènes du genre *Xanthomonas*.

1.1.1 La taxonomie phénotypique

La taxonomie des procaryotes est sans doute l'une des plus récentes taxonomie d'organismes vivants. Même si l'existence des procaryotes n'est réellement connue que depuis le XVII^{ème} siècle, bien avant leur observation, leur existence était déjà envisagée : le physicien Girolamo Fracastoro en 1546 suggérait à l'époque que les maladies étaient causées par des créatures vivantes invisibles. En 1676, dans une lettre adressée à Henry Oldenburg — secrétaire de la Société Royale de Londres —, Antony van Leeuwenhoek (Figure 1.2) relate ses observations microscopiques des « animalcules » ; elles constituent la découverte des bactéries (Howard, 1982). Au cours des XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècles, les « infusions d'animalcules » ont été très largement décrites et observées par les scientifiques de cette époque. Mais curieusement, pendant la centaine d'années qui suivit leurs descriptions, elles ont été pratiquement ignorées et aucune classification n'a été établie (Howard, 1982). Les premiers pas de la taxonomie bactérienne se situent autour du XVIII^{ème} siècle avec les travaux du naturaliste danois Otto Friedrich Müller, qui est le premier à tenter un arrangement taxonomique des bactéries. À partir de l'observation de leur morphologie, il crée deux genres : *Monas* et *Vibrio* (Logan, 1994). La nomenclature de Müller est ensuite adoptée et développée par Ehrenberg au début du XIX^{ème} siècle. Il base son système de classification des bactéries sur leur mobilité et leur forme, en y ajoutant les bactéries hélicoïdales (Howard, 1982). Les noms de certaines de ces espèces sont encore utilisés e.g. *Spirochaeta plicatis* (Logan, 1994). Ce n'est véritablement qu'autour des années 1870 qu'une taxonomie bactérienne aboutit véritablement avec les travaux de Cohn (Cohn, 1872). En accord avec la nomenclature de Müller et des

premiers taxonomistes, il regroupe les bactéries en six genres suivant leur forme : sphérique (*Micrococcus*), de bâtonnets courts (*Bacterium*), de longs bâtons (*Bacillus*), de bâtons courbes (*Vibrio*), spiralée flexible (*Spirochaete*) ou spiralée non-flexible (*Spirillum*) (Howard, 1982).

Jusque dans les années 1960, la taxonomie bactérienne reste dominée par des approches phénotypiques : les taxons sont décrits et différenciés par un faible nombre de caractères qui, selon leur importance, n'ont pas tous le même poids (Vauterin, 1993). Par exemple, un poids important était accordé à la morphologie cellulaire, au Gram, ou au caractère pathogène.

À partir de 1960, la taxonomie devient plus objective. Un plus grand nombre de caractères du phénotype (morphologiques, biochimiques, physiologiques, ...) est étudié en leur accordant à tous le même poids. Les méthodes de caractérisation des bactéries évoluant rapidement, les taxonomistes ont très vite souffert d'un manque d'approches quantitatives pour analyser toutes ces données. En 1957, Sneath révolutionne le sujet par le développement de la taxonomie assistée par ordinateur — la taxonomie numérique — qui a grandement amélioré le traitement des données phénotypiques. L'ensemble des caractéristiques disponibles sur les individus sont codées suivant la présence/absence de chacun de ces caractères. Elles sont utilisées ensuite pour calculer le degré de similitude entre les individus grâce à l'analyse de matrices de grandes tailles.

1.1.2 La taxonomie moléculaire

La période qui a vu le développement de la taxonomie numérique a vu également l'arrivée de la chimiotaxonomie, basée sur l'étude des constituants cellulaires comme les acides nucléiques, les acides aminés, les protéines, les sucres et les lipides des bactéries. La volonté d'obtenir les informations génétiques contenues dans les séquences d'acides nucléiques a suscité un intérêt particulier pour le développement des techniques permettant leurs études. Ainsi durant les années 1960, les connaissances sur les propriétés de l'ADN

et les techniques de biologie moléculaire se sont fortement développées. L'une des idées soutenues à l'époque était que les bactéries devaient être classées par comparaison de leur génome. Initialement, les différences dans la composition en paires de bases de l'ADN des individus — pourcentage de guanine et de cytosine (GC%) — étaient utilisées pour délimiter les espèces (Mendel, 1969). Mais seules les hybridations ADN-ADN (Brenner *et al.*, 1969) ont permis de répondre aux attentes des taxonomistes, à savoir mesurer le degré de relation entre les individus. Elles deviennent la méthode de référence pour délimiter les espèces procaryotes (Wayne *et al.*, 1987).

1.1.3 La taxonomie évolutive

L'un des objectifs fondamentaux des taxonomistes est de développer une taxonomie bactérienne qui reflète les relations de parenté naturelles — relations phylogénétiques — entre les individus. Contrairement aux plantes ou aux animaux, où la reconstruction phylogénétique est aidée par la présence de fossiles et des morphologies complexes, établir une reconstruction phylogénétique pour les bactéries est beaucoup moins aisé du fait de leur morphologie rudimentaire et du manque de données fossiles (Schleifer and Ludwig, 1994). La plus importante des innovations permettant de résoudre les problèmes de cette reconstruction phylogénétique a été fournie en 1965 par les travaux de Zuckerkandl et Pauling. À partir des séquences en acides aminés de l'hémoglobine de plusieurs espèces, ils ont observé que les différences entre les séquences étaient corrélées aux temps géologiques qui les séparaient de leur ancêtre commun. Dès lors, ils reconnaissent que les organismes sont le produit d'évènements historiques, et que toutes les structures cellulaires reflètent leur histoire évolutive. Leurs travaux contribuèrent à la formulation de la théorie évolutive appelée « horloge moléculaire » (Zuckerkandl and Pauling, 1965). Cette hypothèse s'appuie sur la théorie neutraliste de l'évolution développée par Kimura à partir de 1963 (Kimura, 1968) ; il suggère que la vitesse de l'évolution est constante et que la majorité des mutations n'altère pas

le phénotype, leur nombre étant étroitement corrélé avec le temps (Schleifer and Ludwig, 1994). Il devient possible d'évaluer, sur la base des séquences, le temps de divergence des lignées pour lesquelles aucune donnée fossile n'est disponible. Les séquences d'acides nucléiques et de protéines sont utilisées comme marqueurs du temps et permettent d'établir des relations de parenté entre les individus (Stackebrandt, 2000).

Les cytochromes et les ferredoxines ont été les premières molécules à être analysées dans un but de phylogénie (Fitch and Margoliash, 1967). De manière similaire, Woese et Fox (1977) ont utilisé les ARN ribosomiaux comme horloge moléculaire. Ils découvrent que le monde du vivant se divise en trois supers règnes : les archaebactéries, les eubactéries et les eucaryotes. Ces travaux représentent la première reconstruction phylogénétique des procaryotes (Woese, 1987) (Figure 1.3). Les ARNr, l'ARNr 16S (chez les procaryotes) et l'ARNr 18S (chez les eucaryotes) en particulier, sont depuis très largement utilisés en taxonomie. Ils ont toutes les caractéristiques d'une bonne horloge moléculaire : ils sont présents dans toutes les cellules, sont codés par des gènes orthologues (dérivant d'un même ancêtre commun et conservant la même fonction) et ont une structure très conservée. La détermination des relations phylogénétiques à partir de l'ARNr 16S est devenue la procédure universelle de classification du domaine des *Bacteria* (Krieg and Garrity, 2005).

1.1.4 La taxonomie polyphasique

L'émergence de la généalogie bactérienne a fourni également les bases pour développer un concept améliorant l'intégration des informations phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques (Figure 1.4). En effet, les taxonomistes reconnaissaient la nécessité de développer une taxonomie idéale qui reflète le mieux possible à la fois les relations naturelles entre les taxons et qui tient compte du maximum de données disponibles. Le terme de taxonomie polyphasique, introduit dans les années 1970 par Colwell, fait référence à une

1.1 Une vue générale de la taxonomie bactérienne

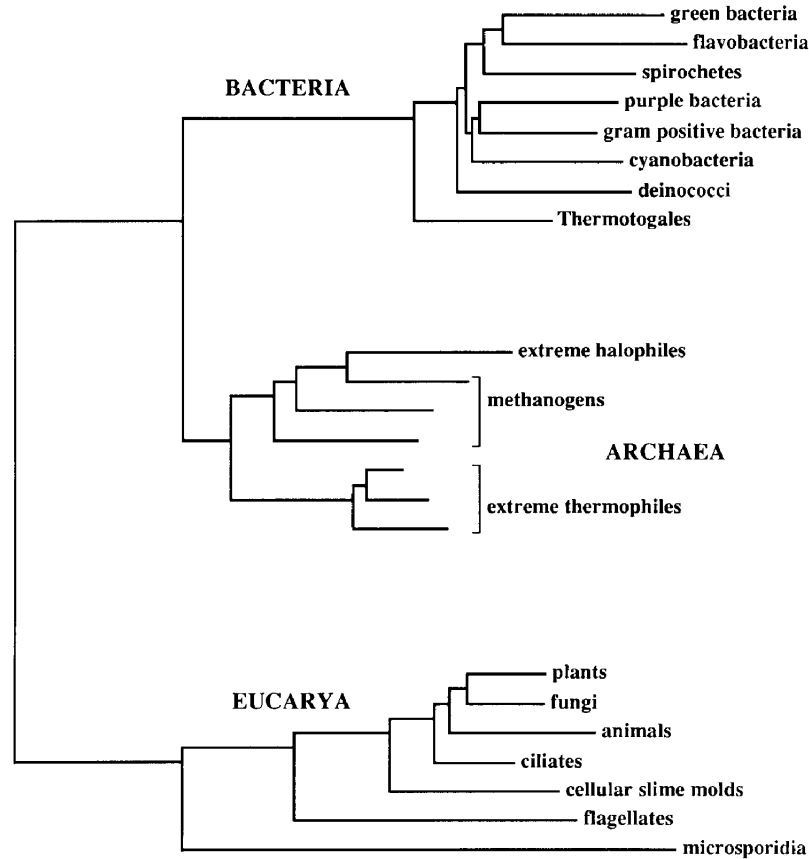


FIG. 1.3 – Arbre phylogénétique universel non enraciné.

L'arbre a été construit à partir d'une matrice de distances génétiques dérivée d'un alignement de séquences des petites sous-unités des ARNr (Woese, 1987) — D'après (Woese, 1999).

taxonomie consensuelle dont l'objectif est d'utiliser toutes les données disponibles sur les bactéries afin de mieux délimiter et désigner, à tous niveaux, les rangs taxonomiques bactériens. Actuellement, les génomes bactériens entièrement séquencés et disponibles sont en constante augmentation, et de plus en plus de taxonomistes voient un intérêt croissant dans l'utilisation de ces séquences génomiques pour étudier les relations phylogénétiques entre les taxons (Coenye *et al.*, 2005) (Figures 1.5 et 1.6).

1.1.5 La classification des bactéries

Il n'existe pas de classification officielle des bactéries. Cependant, il existe une classification qui fait référence : celle publiée dans le « *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* » et qui est utilisée par la majorité des bactériologistes. Cette classification est basée principalement sur les séquences de l'ADNr 16S. La classification du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* reconnaît deux domaines : *Archaea* et *Bacteria*. Chaque domaine est divisé en phylums qui sont eux même subdivisés en classes, ordres, familles, genres puis espèces. Le *Bergey's manual* reconnaît également l'existence de sous-classes, de sous-ordres et de sous-espèces. Le domaine des *Bacteria* regroupe 24 phylums dont les principaux sont représentés sur la figure 1.7.

1.2 La définition des groupes taxonomiques du genre et de l'espèce

1.2.1 La nomenclature des bactéries

Les rangs taxonomiques ont été introduits dans la classification des spécimens biologiques pour faciliter la communication, l'espèce étant l'unité de base de la taxonomie. Le latin ou les noms latinisés ont été choisis comme langage universel pour la nomenclature scientifique des individus. Ainsi sous un

1.2 La définition des groupes taxonomiques du genre et de l'espèce

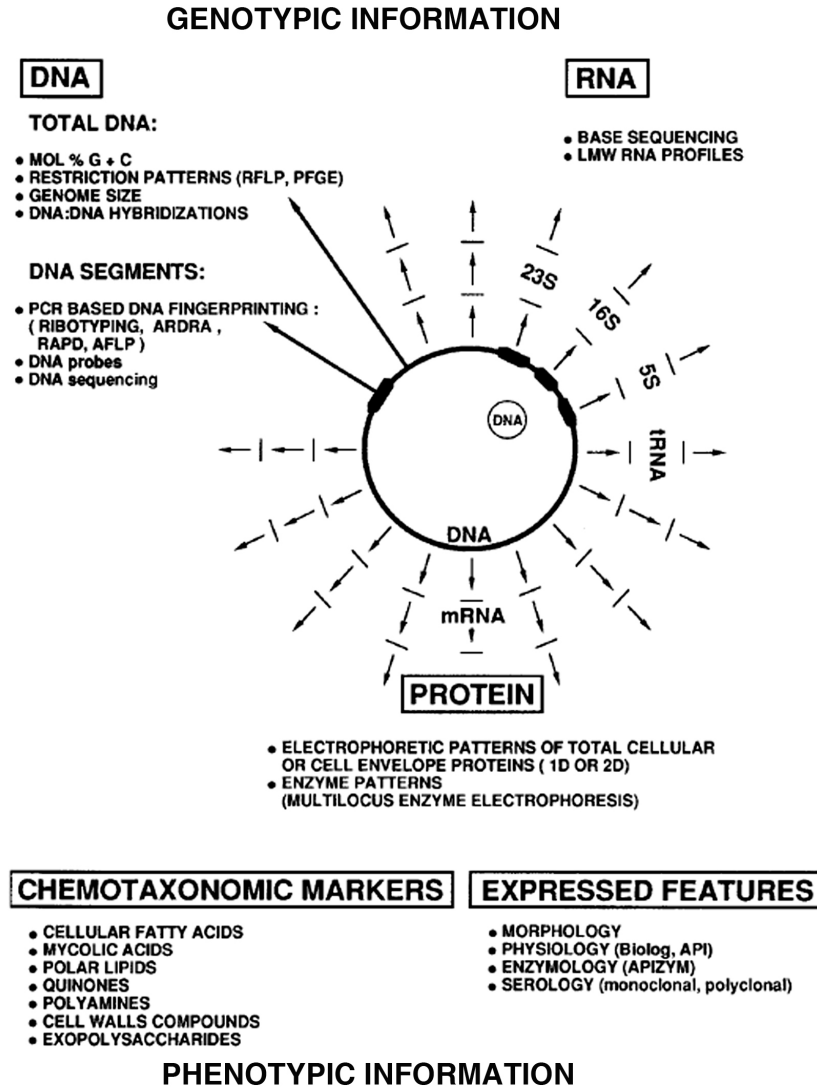


FIG. 1.4 – Représentation des différentes techniques disponibles pour fournir des informations qui seront incorporées dans une taxonomie polyphasique (Vandamme *et al.*, 1996)

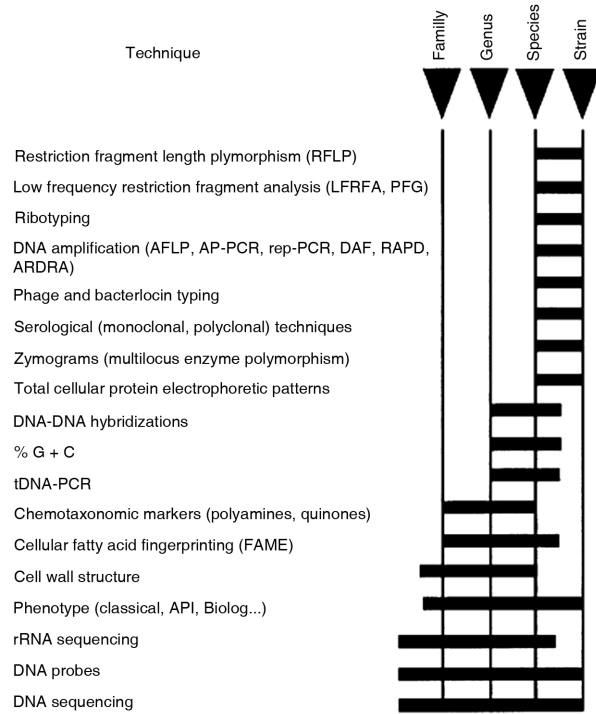


FIG. 1.5 – Techniques couramment utilisées pour la résolution taxonomique d’après (Vandamme *et al.*, 1996)

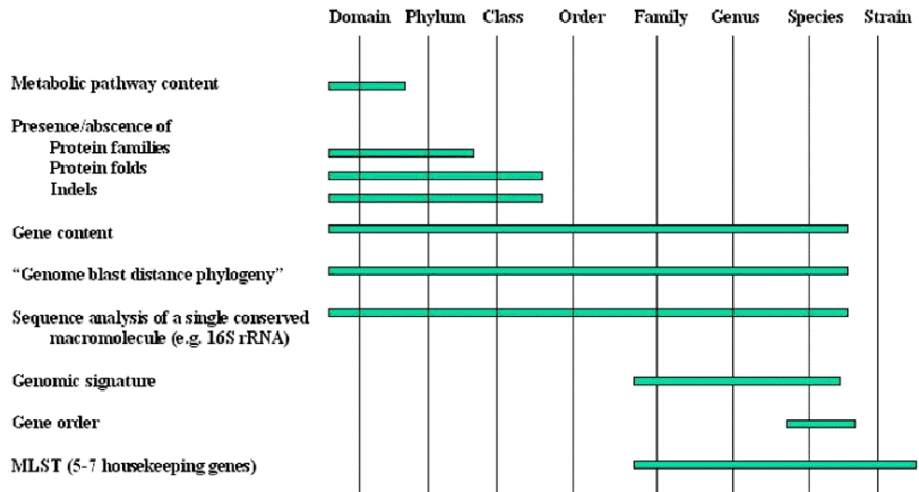


FIG. 1.6 – Nouvelles approches pour déterminer les relations taxonomiques basées sur les séquences du génome en entier d’après (Coenye *et al.*, 2005).

1.2 La définition des groupes taxonomiques du genre et de l'espèce

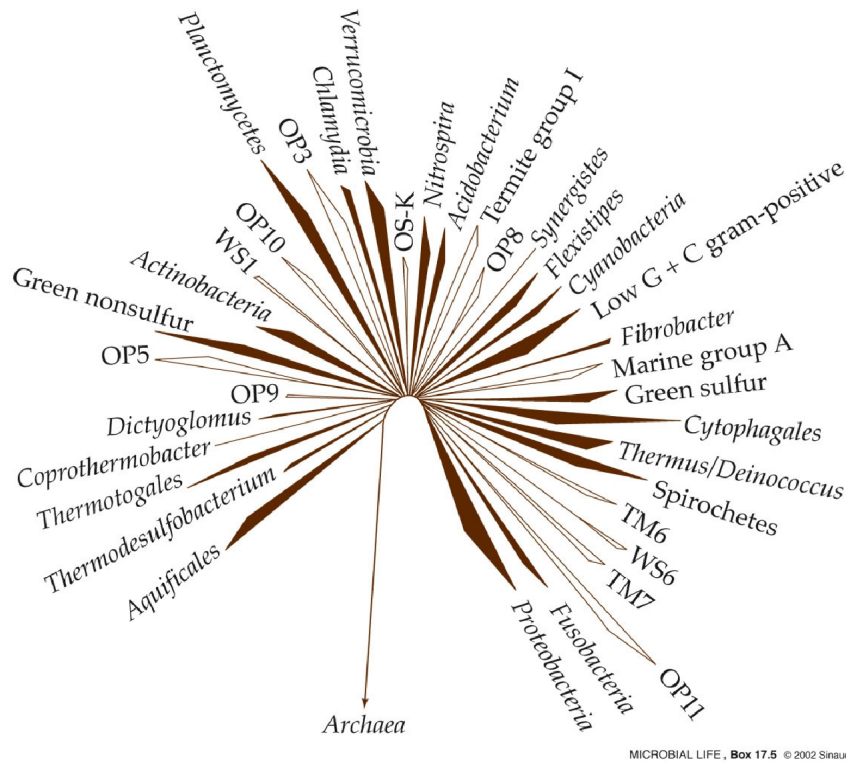


FIG. 1.7 – Arbre phylogénétique établi à partir des séquences de l'ADNr 16S des *Bacteria* représentant les différents phylums. Les phylums représentés par des triangles pleins correspondent aux bactéries cultivables ; les autres correspondent aux bactéries non cultivables (Hugenholtz *et al.*, 1998).

nom unique sont condensées les caractéristiques et les informations permettant de désigner le taxon. Pour être fonctionnel, le système de nomenclature doit être rigoureux, précis, unique, universel et non ambigu. Les Codes de Nomenclature répondent à ces exigences et garantissent une nomenclature correcte des taxons (Euzéby, 2005). Le Code International de Nomenclature des Bactéries¹ (Lapage *et al.*, 1992) est établi par le Comité International de Systématique des Procaryotes². Le système de nomenclature bactérienne suit la nomenclature binomiale décrite par Carl Von Linné en 1753. Ainsi la description d'une espèce ne peut se faire sans la description du genre, et le genre ne peut être décrit sans la description d'au moins une espèce. Chaque genre et chaque espèce est représenté respectivement par son espèce-type et sa souche-type. La validation d'une nomenclature est effective si elle est citée dans les *Approved Lists of Bacterial Names* ou si elle est publiée dans la revue *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM)³ (Euzéby, 2005).

1.2.2 L'espèce bactérienne

La définition de l'espèce bactérienne a constamment été remaniée et a suivi l'évolution de la taxonomie bactérienne. Des comités internationaux, désignés par le Comité International de Systématique Bactériologique (ICSB)⁴, ont été constitués dans le but de proposer une définition de l'espèce. Le premier eut lieu en 1987, et fut présidé par Wayne et le second, présidé par Stackebrandt, eut lieu en 2002. D'après ces deux comités, une espèce bactérienne peut être définie comme un groupe de souches génomiquement proches partageant des caractères phénotypiques et génétiques communs qui les différencient des autres espèces. Pour ces deux comités, la définition de l'espèce

¹*International Code of Nomenclature of Bacteria*

²*International Committee on Systematics of Prokaryotes*, (ICSP)

³Depuis le 1^{er} janvier 2000, et avant cette date dans l'*International Journal of Systematic Bacteriology* (IJSB)

⁴*International Committee of Systematic Bacteriology*

1.2 La définition des groupes taxonomiques du genre et de l'espèce

se base sur les homologues ADN-ADN. Une espèce est définie génétiquement (genomospecies) comme un groupe de souches partageant des valeurs d'hybridations de leur ADN supérieures à 70% avec une valeur $\Delta T_{m(e)}$ (stabilité thermique) inférieure ou égale à 5°C. Cependant, Cohan (2002) souligne qu'il n'existe pas de définition universellement admise de l'espèce bactérienne. Bien que les séquences de l'ARNr 16S soient utilisées pour étudier les relations phylogénétiques entre les individus, elles ne peuvent permettre de définir les espèces bactériennes (Fox *et al.*, 1992; Stackebrandt and Goebel, 1994). Elles sont cependant utiles pour fournir des informations complémentaires aux hybridations ADN-ADN. Si deux souches présentent moins de 97% de similitude dans la séquence de leur ARNr 16S, alors les deux souches appartiennent à deux espèces différentes. En revanche, si le pourcentage de similitude est supérieur à 97%, il est impossible de conclure (Figure 1.8). Lorsqu'une espèce a été identifiée, des caractères phénétiques et génétiques peuvent être utilisés pour la distinguer des autres espèces (Stackebrandt *et al.*, 2002).

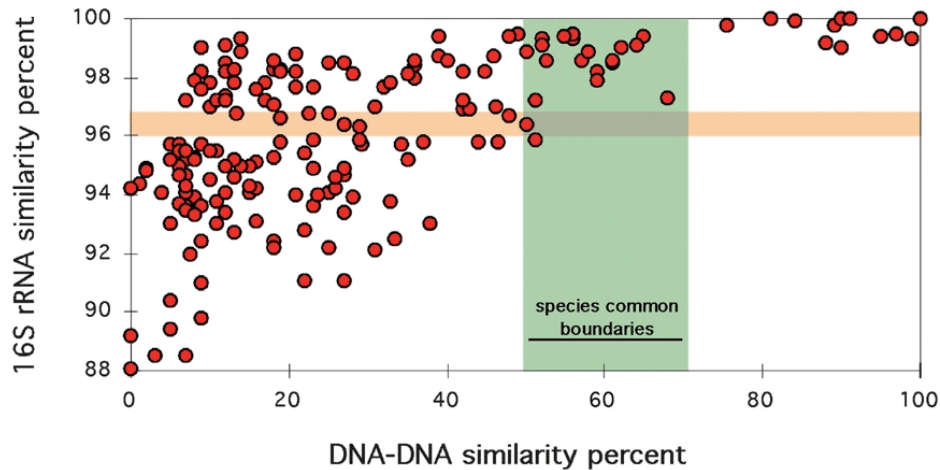


FIG. 1.8 – Comparaison des similitudes entre les hybridations ADN-ADN et l'ARNr 16S d'après Rosselló-Mora and Amann (2001).

Les hybridations ADN-ADN étant des techniques lourdes et délicates à réaliser, le second comité de réévaluation de l'espèce bactérienne (Stackebrandt *et al.*, 2002) a encouragé l'utilisation d'autres techniques comme l'analyse des séquences de divers gènes de ménage par *Multi Locus Sequence Analysis* (MLSA) ou par *Multi Locus Sequence typing* (MLST), l'analyse des séquences de l'espace intergénique entre l'ADNr 16S et l'ADNr 23S, la détermination du profil MLEE (*Multi Locus Enzyme Electrophoresis*), l'AFLP (*Amplified Fragment-Length Polymorphism*), la RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), *etc.*, à condition que les résultats obtenus soient comparables à ceux des hybridations ADN-ADN. Gevers *et al.*, (2005) voient dans le séquençage multiloci de gènes de ménage la technique qui supplanterait les hybridations ADN-ADN (Gevers *et al.*, 2005). Cependant bien que la MLSA soit clairement capable de définir des groupes de séquences sur plusieurs rangs taxonomiques, un problème important est de décider à quel niveau de l'embranchement se situe l'espèce et comment incorporer des données complémentaires indispensables, comme la biologie et l'écologie des populations, dans la définition de l'espèce (Gevers *et al.*, 2005). En effets les microbiologistes ont besoin d'adopter une vision plus naturelle de l'organisme qu'ils étudient, incluant les principes d'écologie et d'évolution, pour pouvoir déterminer comment définir une espèce et les subdivisions au sein de cette espèce.

Cohan (2001) et Gevers *et al.*, (2005) suggèrent que les espèces bactériennes devraient être définies comme des populations qui sont génétiquement cohésives en accord avec les données génétiques apportées par la MLSA et écologiquement distinctes (utilisant des niches différentes) en accord avec les données sur l'écologie des individus.

1.2.3 Le genre bactérien

Toutes les espèces sont assignées à un genre en accord avec la nomenclature binomiale de Linné (1753) ; un genre peut être défini comme une ou plusieurs espèces qui ont des caractéristiques générales phénotypiques iden-

tiques, et qui sont groupées sur la base de la séquence de leur ARNr 16S. On admet également que des bactéries dont le GC% diffèrent de plus de 10% ne doivent pas appartenir au même genre. Cependant il n'existe pas de définition satisfaisante du genre; et comme le soulignent Brenner *et al.*, (2005) il n'en existera peut être jamais, bien que la plupart des nouveaux genres soient décrits sur la base d'analyse de séquences de l'ARNr 16S. Dans la plupart des cas, les genres peuvent être différenciés phénotypiquement même si une grande flexibilité dans la description du genre est nécessaire.

1.3 La taxonomie du genre *Xanthomonas*

1.3.1 Quelques généralités sur les bactéries phytopathogènes

Les bactéries phytopathogènes sont des micro-organismes qui ont une écologie liée aux végétaux et qui sont capables d'attaquer des plantes. Bien que moins importantes en terme de nombre d'espèces que les bactéries pathogènes de l'Homme et des animaux, les bactéries pathogènes des plantes provoquent des maladies qui sont bien souvent dévastatrices pour les grandes cultures, les cultures fruitières et légumières, et sont responsables d'importantes pertes économiques. La plupart des bactéries phytopathogènes sont à Gram négatif et appartiennent au phylum des *Proteobacteria*. Quelques unes cependant sont à Gram positif et appartiennent aux phylums des *Firmicutes* et des *Actinobacteria* (Tableau 1.1).

Les premiers rapports faisant état de maladies provoquées par des bactéries sur des plantes se situent autour des années 1880 avec la description de la maladie du feu bactérien sur des poiriers et des pommiers (Burrill, 1882) (Figure 1.9), de la maladie jaune des hyacinthes (Wakker, 1883) et de la maladie de la tuberculose de l'olivier (Savastano, 1886). Pourtant de nombreux microbiologistes de la fin du XIX^{ème} siècle, fortement influencés par Alfred Fisher

Gram	Phylum	Classe	genre				
+	Firmicutes		<i>Bacillus</i>				
		Clostridia	<i>Clostridium</i>				
		Mollicutes	<i>Candidatus Phytoplasma</i> <i>Spiroplasma</i>				
	Actinobacteria	Actinobacteridae		<i>Arthrobacter</i> <i>Clavibacter</i> <i>Curtobacterium</i> <i>Leifsonia</i> <i>Nocardia</i> <i>Rathayibacter</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Streptomyces</i>			
			Proteobacteria	α -proteobacteria	<i>Acetobacter</i> <i>Candidatus Liberibacter</i> <i>Gluconobacter</i> <i>Rhizobium</i> (syn. <i>Agrobacterium</i>) <i>Sphingomonas</i>		
					β -proteobacteria	<i>Acidovorax</i> <i>Burkholderia</i> <i>Herbaspirillum</i> <i>Janthinobacterium</i> <i>Ralstonia</i> <i>Xylophilus</i>	
						γ -proteobacteria	<i>Brenneria</i> <i>Candidatus Phlomobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Erwinia</i> <i>Pantoea</i> <i>Pectobacterium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhizobacter</i> <i>Samsonia</i> <i>Serratia</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Xylella</i>

TAB. 1.1 – Position taxonomique des principaux genres de procaryotes phytopathogènes.



FIG. 1.9 – Symptômes du Feu bactérien provoqués par *Erwinia amylovora* sur arbres fruitiers, découvert par Burrill en 1878 (APSnet)

— microbiologiste allemand du domaine médical —, pensent que ces bactéries retrouvées dans les plantes ne sont que des parasites secondaires. Elles coloniseraient la plante bien après l'attaque des champignons qui, seuls, seraient capables de dégrader les cellules végétales vivantes. Erwin Frink Smith (Figure 1.10), phytopathologiste et bactériologiste, n'a eu de cesse de prouver que les bactéries comme les champignons étaient capables d'induire des maladies. Cependant, les moyens disponibles de l'époque étaient bien souvent inappropriés pour répondre aux problèmes, et le débat entre les deux scientifiques a duré pendant une dizaine d'années. En 1901, Smith met fin au débat en publiant une discussion très détaillée sur les critères permettant de démontrer le pouvoir pathogène de l'organisme mis en cause.

Durant les décennies qui suivirent, les bactéries phytopathogènes ont été étudiées exclusivement par des phytopathologistes, et il n'y avait que très peu de contacts entre les phytobactériologistes et les autres bactériologistes du domaine médical. Cette division au sein de la discipline s'est retrouvée dans la taxonomie bactérienne de l'époque. Il existait un taxon de bactéries phy-

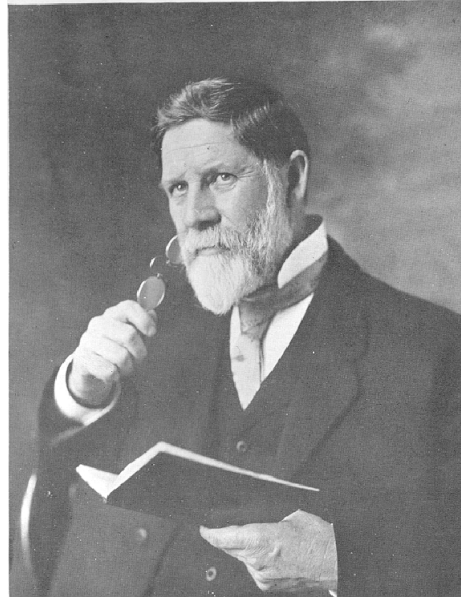


FIG. 1.10 – Portrait de Erwin F. Smith, tiré de (Whetzel, 1918)

topathogènes bien séparé des autres bactéries. Dans la première édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1923), les bactéries phytopathogènes étaient regroupées dans la tribu des *Erwinieae*, définie simplement comme « pathogène des plantes » (Bergey *et al.*, 1923). La tribu des *Erwinieae* était à son tour subdivisée en deux genres : *Erwinia* et *Phytomonas*.

1.3.2 Une taxonomie basée sur le pouvoir pathogène

Durant le siècle qui suivit la découverte de Wakker (1883) d'une maladie jaune sur hyacinthes causée par une bactérie formant des colonies jaunes — faisant référence de nos jours à une bactérie du genre *Xanthomonas* —, plusieurs bactéries du même type, isolées de plantes, furent découvertes. En 1930, Burkholder fait une étude comparative des différentes bactéries contenues dans le genre *Phytomonas* et propose des regroupements d'espèces ; l'un de ces groupes formera le genre *Xanthomonas* (Dawson, 1939). L'une des

1.3 La taxonomie du genre *Xanthomonas*

caractéristiques des *Xanthomonas* est leur grande diversité pathologique et l'apparente spécificité d'hôte de ces membres. À l'origine chaque variant montrant une gamme d'hôtes différente ou produisant des symptômes particuliers était classé dans une nouvelle espèce. Cette pratique courante a été appelée le concept « *new host-new species* » par Starr (1981). Le nombre d'espèces résultant de cette pratique s'accrut très rapidement, créant un genre particulièrement complexe composé de plus d'une centaine d'espèces. Par opposition à la grande diversité pathologique des *Xanthomonas*, les tests microbiologiques disponibles à l'époque montraient une très grande homogénéité phénotypique au sein de ce genre.

En 1974, Dye et Lelliot dans le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* réduisent le nombre d'espèces du genre *Xanthomonas* à cinq : *X. campestris* (espèce type), *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. axonopodis* et *X. ampelina*. Ils précisent qu'une nouvelle espèce ne pourra être décrite que si les caractères qui la différencient de l'espèce type, *X. campestris*, sont autres que la seule spécificité d'hôte. En 1976, le Code International de Nomenclature des Bactéries (Lapage *et al.*, 1975) est révisé, il fournit les nouvelles règles de nomenclature à appliquer et précise que seuls les noms publiés dans les *Approved Lists of Bacterial Names* de l'ICSB après le 1^{er} janvier 1980 seront valides. Les noms publiés antérieurement à cette date ne faisant pas partie de la nouvelle liste, n'auront plus de place dans la nomenclature, et pourront être librement réutilisés pour nommer de nouveaux taxons.

Pour les *Xanthomonas*, seules les espèces publiées dans la 8^{ème} édition du *Bergey's Manual* (1974) se trouvèrent dans les *Approved Lists*. La plupart des espèces nouvellement décrites (*nomenspecies*) mais non validées dans les *Approved Lists of Bacterial Names* ont ainsi été regroupées sous le même nom d'espèce : *Xanthomonas campestris*. Cette nouvelle nomenclature a très vite posé problème car les pathogènes ne pouvaient plus être différenciés au sein de l'espèce ; ainsi, les phytopathologistes ont continué à utiliser les anciens noms (Young *et al.*, 1978).

Afin de remédier à ce problème, le Comité Exécutif de la Société Internationale des Pathologies des Plantes (ISPP)⁵ crée le Comité Taxonomique des Bactéries Phytopathogènes⁶, dont l'objectif est de statuer sur les conséquences de la révision du code de 1976 pour les bactéries pathogène des plantes, et de faire des recommandations sur les noms à soumettre dans les *Approved Lists*. Ainsi pour faciliter la communication sur ces différents pathogènes, trois listes de noms ainsi qu'une nomenclature spécifique aux bactéries pathogènes des plantes (Young *et al.*, 1978) ont été soumises au Comité *Ad Hoc* de l'ICSB . Cette nouvelle nomenclature, conforme au Code de Nomenclature Internationale, subdivise les espèces en pathovars, terme utilisé pour désigner les organismes sur la base de leur gamme d'hôtes et de leur pouvoir pathogène. Alors que certains noms d'espèces ont été acceptés dans les *Approved Lists*, la nomenclature en pathovars des taxons d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce (Dye *et al.*, 1980) n'a pas été acceptée. Cependant l'ISPP assure que la désignation en pathovar permettrait d'éviter les confusions de nomenclature et publie une liste de noms de pathovars et des standards d'utilisation de cette épithète infrasubspécifique connue sous le nom de « *International Standards for Naming Pathovars of Phytopathogenic Bacteria* » (Dye *et al.*, 1980), complémentaires au Code. Cette nomenclature a été adoptée comme une solution provisoire jusqu'à ce qu'une classification soit établie sur la base de principes plus généralement acceptés (Vauterin and Swings, 1997).

Ainsi, bien que la taxonomie des bactéries phytopathogènes ait suivi les tendances et les développements généraux de la taxonomie bactérienne, la spécificité d'hôte a joué un rôle prépondérant dans cette classification.

⁵ *Executive Committee of the International Society for Plant Pathology (ISPP)*

⁶ *Committee on Taxonomy of Phytopathogenic Bacteria*

1.3.3 La taxonomie moléculaire et évolutive du genre *Xanthomonas*

Selon la dernière édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005), le genre *Xanthomonas* appartient au domaine des *Eubacteria*, phylum des *Proteobacteria* (XIV), classe des *Gammaproteobacteria* (III), ordre des *Xanthomonadales* (III) et à la famille des *Xanthomonadaceae* (I) (Saddler and Bradbury, 2005). Le genre *Xanthomonas* faisait auparavant partie de la famille des *Pseudomonadaceae*. Des travaux sur les hybridations ADN-ARNr (De Vos and De Ley, 1983) ont révélé que les genres *Xanthomonas* et *Pseudomonas* constituaient des genres bien distincts au sein des gamma-protéobactéries (Stackebrandt *et al.*, 1988), il était auparavant très difficile de les différencier phénotypiquement avec les outils disponibles (De Ley, 1992).

À cette époque, selon le *Bergey's Manual* (Dye and Lelliot, 1974) (Figure 1.11) le genre *Xanthomonas* est constitué de cinq espèces : *X. campestris* (espèce type), *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. axonopodis* et *X. ampelina*, et plusieurs propositions ont été formulées pour en modifier le nombre. La position de l'espèce *X. ampelina*, notamment, a été particulièrement discutée. En 1983, De Vos et De Ley ont montré que cette espèce n'appartenait pas au genre *Xanthomonas* et que sa position taxonomique exacte restait inconnue. Par une approche polyphasique, cette espèce a été élevée à un rang taxonomique supérieur formant le nouveau genre *Xylophilus* sous le nom de *Xylophilus ampelinus* (Willems *et al.*, 1987).

À l'inverse, certaines espèces appartenant à d'autres genres ont été placées dans le genre *Xanthomonas* (De Vos *et al.*, 1985) comme *Aplanobacter populi*, agent du chancre du peuplier, qui devient formellement une nouvelle espèce du genre *Xanthomonas* (De Vos and De Ley, 1983; Ridé and Ridé, 1978). Des travaux sur les caractéristiques phénotypiques et génotypiques sur les *Pseudomonas maltophilia*, ont conduit Swings *et al.*, (1983) à classer cette espèce dans le genre *Xanthomonas*. En 1990, Van den Mooter et Swings étudient les caractères phénotypiques de plus de 268 souches appar-

Chapitre 1. Situation des *Xanthomonas* dans la taxonomie des bactéries

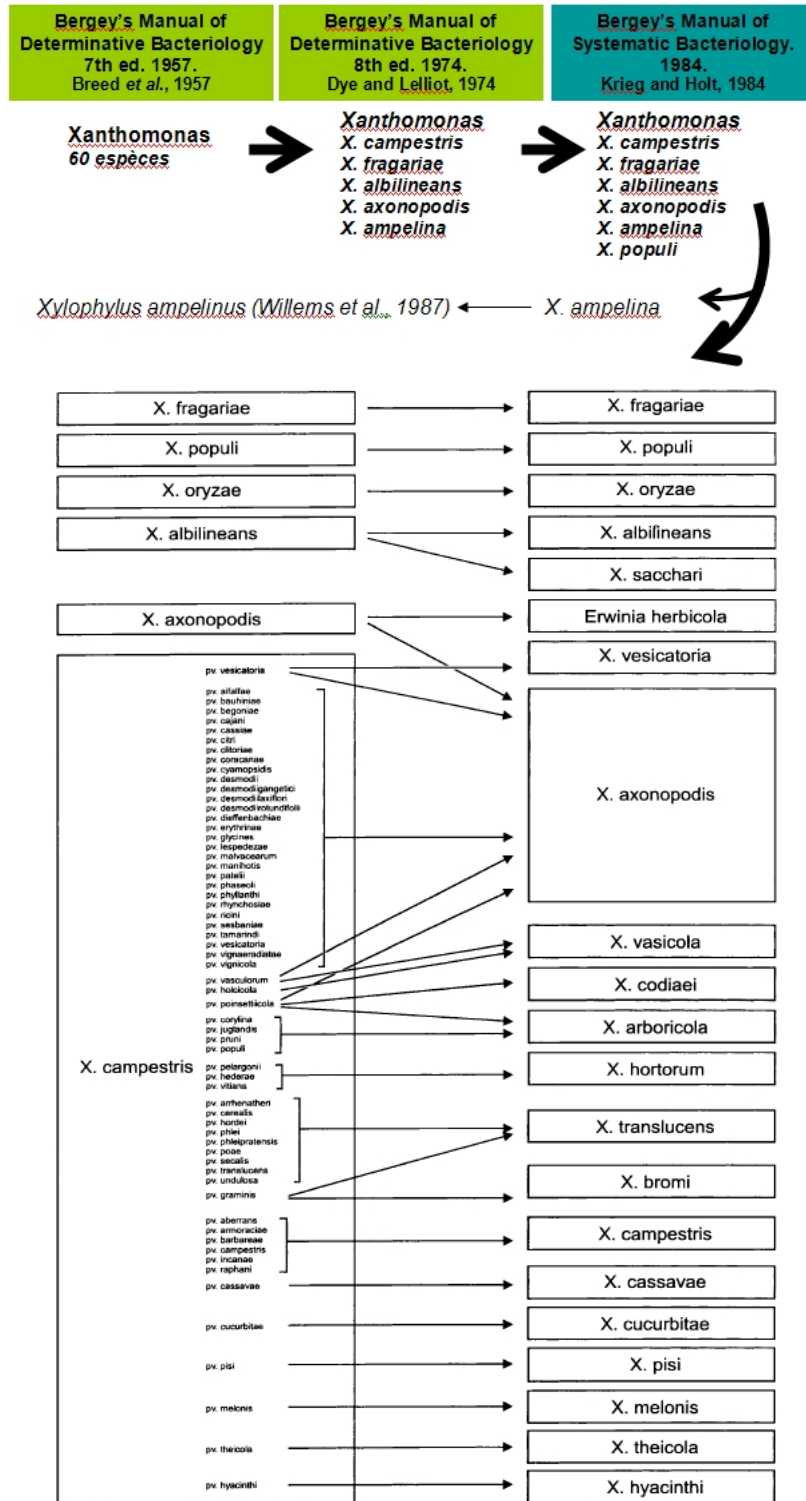


FIG. 1.11 – Évolution de la nomenclature des *Xanthomonas*

1.3 La taxonomie du genre *Xanthomonas*

tenant au genre *Xanthomonas* et montrent que les *X. campestris* pv. *graminis* et pv. *oryzae* sont clairement différents des autres pathovars de l'espèce *X. campestris*. Ils proposent alors que le genre soit composé de huit espèces : *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. graminis*, *X. oryzae*, *X. maltophilia* et *X. populi*. Le transfert de *X. maltophilia* a été particulièrement controversé car la bactérie diffère des autres *Xanthomonas* sur plusieurs caractères phénotypiques. En 1993, *X. maltophilia* est reclassé dans le genre *Stenotrophomas maltophilia* par Palleroni et Bradbury. L'espèce la plus complexe reste *X. campestris*, qui regroupe plus de 140 pathovars (Dye *et al.*, 1980). Il devient de plus en plus évident que la classification en cours ne reflète pas les relations génomiques au sein des *Xanthomonas* (Vauterin *et al.*, 1990). En 1987 le comité de réévaluation de l'espèce bactérienne recommande la technique des hybridations ADN-ADN (Wayne *et al.*, 1987) pour délimiter les espèces génomiques, et l'utilisation de cette technique a particulièrement révolutionné la taxonomie du genre *Xanthomonas*. Vauterin *et al.*, (1995) réalisent des hybridations ADN-ADN sur 183 souches du genre *Xanthomonas*. Ils identifient 20 groupes d'homologie ADN et proposent que le genre *Xanthomonas* soit divisé en 20 espèces (figure 1.11). Leurs travaux ont grandement amélioré la taxonomie des *Xanthomonas* car de nombreux pathovars de l'espèce *X. campestris* ont été élevés au rang d'espèces ou placés dans des espèces déjà existantes. Néanmoins un trop grand nombre de pathovars restaient encore non attribués à une espèce, et étaient placés par défaut dans l'espèce type *X. campestris*.

Alors que les hybridations ADN-ADN permettent d'identifier des groupes génomiques, établir les relations phylogénétiques entre les différents taxons n'est possible qu'en mesurant le degré de similitude entre les séquences d'ADN. C'est dans cet objectif que les premiers travaux sur l'histoire évolutive des *Xanthomonas* ont été réalisés. Les relations phylogénétiques entre les différentes espèces du genre ont été déterminées par le séquençage de l'ADNr 16S (Hauben *et al.*, 1997) (figure 1.12). Leur analyse a révélé un faible degré

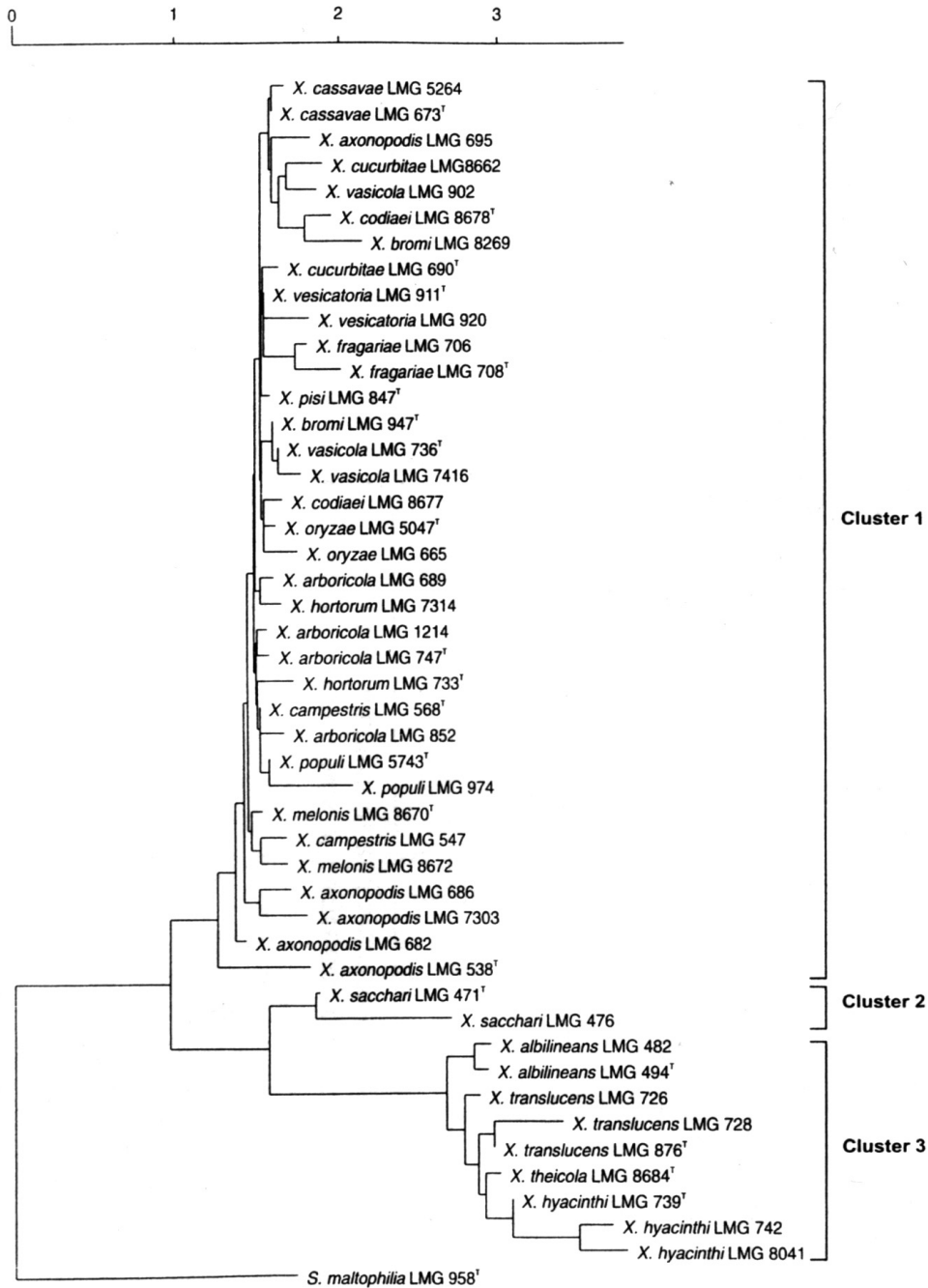


FIG. 1.12 – Arbre phylogénétique du genre *Xanthomonas* à partir des séquences de l'ADNr 16S (Hauben *et al.*, 1997).

1.3 La taxonomie du genre *Xanthomonas*

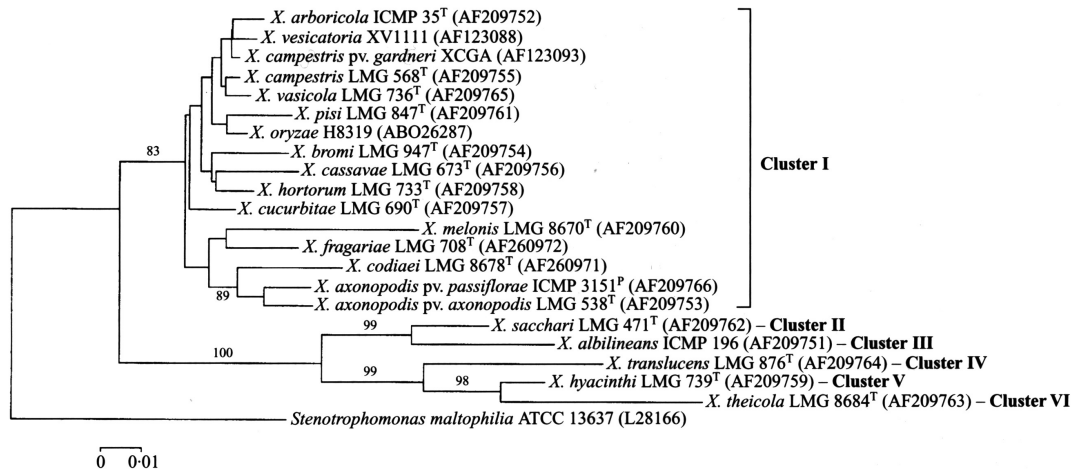


FIG. 1.13 – Arbre phylogénétique du genre *Xanthomonas* à partir des séquences de l'ITS ADNr 16S - ADNr 23S (Gonçalves et Rosato, 2002).

de divergence parmi les *Xanthomonas* avec seulement trois lignées détectées, la plus grande contenant plus de 15 espèces. En 2002, Gonçalves et Rosato affinent la phylogénie du genre *Xanthomonas* par le séquençage de l'espace intergénique entre les ADNr 16S et ADNr 23S, en définissant six groupes. Le groupe I rassemble une quinzaine d'espèces. Chacune des espèces *X. albilineans*, *X. sacchari*, *X. hyacinthi*, *X. theicola* et *X. translucens* représente respectivement des groupes distincts (II-VI) (figure 1.13). L'arbre généré reste cependant très similaire à l'arbre fait à partir du séquençage de l'ADNr 16S (figure 1.12) et ne permet pas de discriminer les groupes génomiques définis par les hybridations ADN-ADN.

Dernièrement, Rademaker *et al.*, (2005) ont utilisé les méthodes de typage moléculaire : BOX-PCR (*conserved repetitive sequences*-PCR), ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*-PCR), et REP-PCR (*repetitive extragenic palindromic*-PCR) pour clarifier la taxonomie des *Xanthomonas*. Plus de 300 souches ont été typées, certaines appartenant aux 20 groupes génomiques identifiés par Vauterin *et al.*, (1995), et 160 souches appartenant

aux pathovars orphelins qui n’avaient pas été caractérisées par des hybridations ADN-ADN. L’analyse des profils rep-PCR a permis de rassembler les souches en groupes distincts correspondant directement aux 20 groupes d’homologie ADN-ADN (*genomospecies*) précédemment identifiés. Leur technique a permis également de caractériser la diversité infraspécifique pour les espèces *X. hortorum*, *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. oryzae*, *X. campestris*, et *X. translucens*.

Noms rejetés	Noms retenus ou proposés ^(a)
<i>Xanthomonas arboricola</i> (Vauterin <i>et al.</i> , 1995), avec pvs. <i>corylina</i> , <i>juglandis</i> , <i>pruni</i> , et <i>poinsettiicola</i> type C	Remplacé par <i>X. juglandis</i> pvs. <i>juglandis</i> , <i>corylina</i> , et <i>pruni</i>
<i>X. axonopodis</i> (Starr and Garces, 1950), (Vauterin <i>et al.</i> , 1995), et tous les pathovars proposés ^(a)	Retenu <i>X. axonopodis</i> , mais pas les pathovars proposés
<i>X. bromi</i> (Vauterin <i>et al.</i> , 1995)	Retenu comme un pathovar de <i>X. campestris</i>
<i>X. codiaei</i> (Vauterin <i>et al.</i> , 1995)	Retenu comme <i>X. campestris</i> pv. <i>poinsettiicola</i> type B
<i>X. hortorum</i> (Vauterin <i>et al.</i> , 1995), avec pvs. <i>hortorum</i> , <i>hederae</i> , <i>pelargonii</i> , et <i>vitians</i> type B	Remplacé par <i>X. hederae</i> pvs. <i>hederae</i> et <i>pelargonii</i> et Retenu <i>vitians</i> type B comme un pathovar de <i>X. campestris</i>
<i>X. melonis</i> (Neto <i>et al.</i> , 1984), Vauterin <i>et al.</i> , 1995	Retenu comme <i>X. campestris</i> pv. <i>melonis</i>
<i>X. sacchari</i> (Vauterin <i>et al.</i> , 1995)	<i>X. albilineans</i>
<i>X. theicola</i> (Uehara <i>et al.</i> , 1980), Vauterin <i>et al.</i> , 1995	Retenu comme <i>X. campestris</i> pv. <i>theicola</i>
<i>X. translucens</i> pvs. <i>arrhenatheri</i> , <i>graminis</i> , <i>phlei</i> , <i>phleipratensis</i> , et <i>poae</i> (Vauterin <i>et al.</i> , 1995)	Retenu comme un pathovars de <i>X. campestris</i>
<i>X. vasicola</i> (Vauterin <i>et al.</i> , 1995), avec pvs. <i>holcicola</i> et <i>vasculorum</i> type B	Retenu comme <i>X. campestris</i> pvs. <i>holcicola</i> et <i>vasculorum</i>
<i>X. vesicatoria</i> type B (ex Doidge, 1920), Vauterin <i>et al.</i> , 1995	Retenu <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> pour la souche type A ; proposition de l’épithète <i>exitiosa</i> pour la souche type B ^(c)

^(a) Les noms proposés sont surlignés.

^(b) Les pathovars de *X. axonopodis* (Vauterin *et al.*, 1995) proposés suivant devraient être retenus comme des pathovars de *X. campestris* jusqu’à ce que des données suffisantes soient disponibles : *alfalfae*, *bauhiniae*, *begoniae*, *cajani*, *cassavae* (type B), *cassiae*, *citri*, *clitoriae*, *coracanae*, *cyamopsidis*, *desmodii*, *desmodiigangetici*, *desmodiilaxiflori*, *desmodirotundifolii*, *dieffenbachiae*, *erythrinae*, *glycines*, *lespedezae*, *malvacarum*, *manihotis*, *patelii*, *phaseoli*, *phyllanthi*, *poinsettiicola* (type A), *rhynchosiae*, *ricini*, *sesbaniae*, *tamarindi*, *vasculorum* (type A), *vesicatoria* (type A), *vignaeradiatae*, *vignicola*, et *vitians* (type A).

^(c) Toutes les souches type A du pv. *vesicatoria*, incluant la souche type, doivent être gardées dans *X. campestris*.

TAB. 1.2 – Tableau résumant les noms rejetés, retenus ou proposés par (Schaad *et al.*, 2000)

1.3.4 Une grande polémique autour de la nomenclature des *Xanthomonas*

Depuis 1995, date à laquelle Vauterin et ses collaborateurs révolutionnent la taxonomie des *Xanthomonas*, une polémique s'est installée entre Schaad *et al.* et Vauterin *et al.* (2000). Schaad *et al.* (2000) n'ont pas totalement approuvé la nouvelle nomenclature des *Xanthomonas*. Ils dénoncent dans la publication de Vauterin *et al.* (1995) des erreurs de nomenclature dues à une mauvaise interprétation du Code de Nomenclature des Bactéries (Lapage *et al.*, 1992). Ils invalident alors certaines espèces et proposent de nouvelles nomenclatures (Tableau 1.2) (Schaad *et al.*, 2000). Vauterin *et al.*, (2000) en réponse à l'article de Schaad *et al.* (2000) argumentent et renouvellent leur position en faveur de leur nomenclature. L'année suivante, le Comité Taxonomique des Bactéries Phytopathogènes de l'ISPP, présidé par Young statue sur la taxonomie des *Xanthomonas*, accepte en grande partie la nomenclature de Vauterin *et al.*, (1995) et invalide les noms proposés par Schaad *et al.* (Young *et al.*, 2001). La taxonomie des bactéries pathogènes des plantes est toujours régulièrement révisée par ce comité; Young précise que pour le genre *Xanthomonas* ces révisions sont à l'heure actuelle encore incomplètes (Young *et al.*, 2005). Depuis, quatre espèces ont été intégrées au genre *Xanthomonas* et validées par le Code de Nomenclature des Bactéries (Lapage *et al.*, 1992) : *Xanthomonas cynarae* (Trébaol *et al.*, 2000), *Xanthomonas euvesicatoria* (Jones *et al.*, 2004), *Xanthomonas gardneri* (ex Sutic 1957) (Jones *et al.*, 2004), *Xanthomonas perforans* (Jones *et al.*, 2004) (*validation list* n°109 IJSEM 2006 (56) : 925-927). Trois autres espèces sont en attente de validation : *Xanthomonas smithii* (subsp. *smithii* et subsp. *citri*) (Schaad *et al.*, 2005 sp. nov), *Xanthomonas fuscans* (subsp. *fuscans* et subsp. *aurantifolii*) (Schaad *et al.*, 2005 sp. nov.), *Xanthomonas alfalfae* (subsp. *alfalfae* et subsp. *citrumelo*) (Schaad *et al.*, 2005 sp. nov.). Cependant le Code de Nomenclature, pour la description de ces trois nouvelles espèces, n'a pas été respecté et une note corrective est actuellement en attente de publication;

Xanthomonas smithii (subsp. *smithii* et subsp. *citri*) (Schaad *et al.*, 2005 sp. nov), deviendrait *Xanthomonas citri* (subsp. *citri* et subsp. *malvacearum*) et *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelo* serait remplacé par *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (M. Le Saux, communication personnelle). Nous tiendrons compte des rectifications de nomenclature dans la suite de ce manuscrit.

Le tableau 1.3 présente les dernières évolutions de la nomenclature du genre *Xanthomonas*. Bien que les travaux récents de Rademaker *et al.*, (2005) aient clarifié la position taxonomique d'un certain nombre de pathovars, un trop grand nombre d'entre eux restent encore non attribués à une espèce, contribuant ainsi à une mauvaise clarté de la taxonomie des *Xanthomonas*. En effet, par défaut ces pathovars sont classés dans l'espèce type *X. campestris* (Tableau 1.4). De plus, de nombreux pathologistes persistent à utiliser l'ancienne nomenclature, ajoutant une difficulté supplémentaire à la lisibilité et à la compréhension des travaux actuels sur ces bactéries pathogènes de plantes.

1.3 La taxonomie du genre *Xanthomonas*

Avant 1995	<i>Xanthomonas</i> . Dowson 1939 (Vauterin <i>et al.</i> , 1995 ; Trébaol <i>et al.</i> , 2000 ; Jones <i>et al.</i> , 2004 ; Schaad <i>et al.</i> , 2005)	En attente de validation
	<i>X. albilineans</i>	
	<i>X. arboricola</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>celebensis</i>	pv. <i>celebensis</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>corylina</i>	pv. <i>corylina</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>juglandis</i>	pv. <i>juglandis</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>poinsettiicola</i>	pv. <i>poinsettiicola</i> non valide	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>poinsettiicola</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>populi</i>	pv. <i>populi</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>pruni</i>	pv. <i>pruni</i>	
	<i>X. axonopodis</i>	
	pv. <i>axonopodis</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>alfalfae</i>	pv. <i>alfalfae</i>	<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>alfalfae</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>allii</i>	pv. <i>allii</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>bauhiniae</i>	pv. <i>bauhiniae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>begoniae</i>	pv. <i>begoniae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>betlicola</i>	pv. <i>betlicola</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>biophyti</i>	pv. <i>biophyti</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>cajani</i>	pv. <i>cajani</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>cassavae</i> B	pv. <i>cassavae</i> non valide	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>cassavae</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>cassiae</i>	pv. <i>cassiae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i> A	pv. <i>citri</i>	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i> B (<i>aurantifolii</i>)	pv. <i>aurantifolii</i> non valide	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i> C (<i>aurantifolii</i>)	pv. <i>aurantifolii</i> non valide	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i> D (<i>aurantifolii</i>)	pv. <i>aurantifolii</i> non valide	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>citri</i> E (<i>citrumelo</i>)	pv. <i>citrumelo</i> non valide	<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>clitoriae</i>	pv. <i>clitoriae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>coracanae</i>	pv. <i>coracanae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>cyamopsidis</i>	pv. <i>cyamopsidis</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>desmodii</i>	pv. <i>desmodii</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>desmodiigangetici</i>	pv. <i>desmodiigangetici</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>desmodiilaxiflori</i>	pv. <i>desmodiilaxiflori</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>desmodiitrotundifolii</i>	pv. <i>desmodiitrotundifolii</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	pv. <i>dieffenbachiae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>erythrinae</i>	pv. <i>erythrinae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>fascicularis</i>	pv. <i>fascicularis</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>glycines</i>	pv. <i>glycines</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>khayae</i>	pv. <i>khayae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>lespedezae</i>	pv. <i>lespedezae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>maculifoliigardeniae</i>	pv. <i>maculifoliigardeniae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	pv. <i>malvacearum</i>	<i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>	pv. <i>manihotis</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>martyuicola</i>	pv. <i>martyuicola</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>melhusii</i>	pv. <i>melhusii</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>nakataecorchori</i>	pv. <i>nakataecorchori</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>patelii</i>	pv. <i>patelii</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>pedalii</i>	pv. <i>pedalii</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	pv. <i>phaseoli</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> var <i>fuscans</i>	pv. <i>phaseoli</i> var <i>fuscans</i> non valide	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>phyllanthi</i>	pv. <i>phyllanthi</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>physalidicola</i>	pv. <i>physalidicola</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>poinsettiicola</i>	pv. <i>poinsettiicola</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>punicae</i>	pv. <i>punicae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>rhynchosiae</i>	pv. <i>rhynchosiae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>ricini</i>	pv. <i>ricini</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>sesbaniae</i>	pv. <i>sesbaniae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>tamarindi</i>	pv. <i>tamarindi</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>vasculorum</i>	pv. <i>vasculorum</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>vignaeradiatae</i>	pv. <i>vignaeradiatae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>vignicola</i>	pv. <i>vignicola</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i> A	pv. <i>vitians</i>	

Chapitre 1. Situation des *Xanthomonas* dans la taxonomie des bactéries

Avant 1995	<i>Xanthomonas</i> . Dowson 1939 (Vauterin <i>et al.</i> , 1995; Trébaol <i>et al.</i> , 2000; Jones <i>et al.</i> , 2004; Schaad <i>et al.</i> , 2005)	En attente de validation
	<i>X. bromi</i>	
	<i>X. campestris</i>	
	pv. <i>aberrans</i>	
	pv. <i>armoraciae</i>	
	pv. <i>barbareae</i>	
	pv. <i>campestris</i>	
	pv. <i>incanae</i>	
	pv. <i>raphani</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>cassavae</i> A	<i>X. cassavae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>poinsettiicola</i> B	<i>X. codiae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i>	<i>X. cucurbitae</i>	
	<i>X. cynarae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> A	<i>X. euvesicatoria</i>	
	<i>X. fragariae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> D	<i>X. gardneri</i>	
	<i>X. hortorum</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>carotae</i>	pv. <i>carotae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>hederae</i>	pv. <i>hederae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>pelargonii</i>	pv. <i>pelargonii</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>taraxaci</i>	pv. <i>taraxaci</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i> B	pv. <i>vitians</i> non valide	<i>X. hortorum</i> pv. <i>vitians</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>hyacinthi</i>	<i>X. hyacinthi</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>melonis</i>	<i>X. melonis</i>	
	<i>X. oryzae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	pv. <i>oryzae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>oryzicola</i>	pv. <i>oryzicola</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> C	<i>X. perforans</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>pisi</i>	<i>X. pisi</i>	
	<i>X. populi</i>	
<i>X. albilineans</i>	<i>X. sacchari</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>theicola</i>	<i>X. theicola</i>	
	<i>X. translucens</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>arrhenatheri</i>	pv. <i>arrhenatheri</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>cerealis</i>	pv. <i>cerealis</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>graminis</i>	pv. <i>graminis</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>hordei</i>	pv. <i>hordei</i> non valide	
<i>X. campestris</i> pv. <i>phlei</i>	pv. <i>phlei</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>phleipratensis</i>	pv. <i>phleipratensis</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>poae</i>	pv. <i>poae</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>secalis</i>	pv. <i>secalis</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>translucens</i>	pv. <i>translucens</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>undulosa</i>	pv. <i>undulosa</i>	
	<i>X. vasicola</i>	
	pv. <i>holcicola</i>	
<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> B	<i>X. vesicatoria</i>	

TAB. 1.3 – Dernières évolutions de la nomenclature du genre *Xanthomonas* d'après Young *et al.* (2005)

1.3 La taxonomie du genre *Xanthomonas*

<i>X. pv. alangii</i>	<i>X. pv. leana</i>
<i>X. pv. amaranthicola</i>	<i>X. pv. leersiae</i>
<i>X. pv. amorphophalli</i>	<i>X. pv. malloti</i>
<i>X. pv. aracearum</i>	<i>X. pv. mangiferaeindicae</i>
<i>X. pv. arecae</i>	<i>X. pv. merremiae</i>
<i>X. pv. argemones</i>	<i>X. pv. mirabilis</i>
<i>X. pv. arracaciae</i>	<i>X. pv. musacearum</i>
<i>X. pv. azadirachtae</i>	<i>X. pv. nigromaculans</i>
<i>X. pv. badrii</i>	<i>X. pv. olitorii</i>
<i>X. pv. betae</i>	<i>X. pv. papavericola</i>
<i>X. pv. bilvae</i>	<i>X. pv. parthenii</i>
<i>X. pv. blepharidis</i>	<i>X. pv. passiflorae</i>
<i>X. pv. boerhaaviae</i>	<i>X. pv. paullinae</i>
<i>X. pv. brunneivaginatae</i>	<i>X. pv. pennamericanum</i>
<i>X. pv. cannabidis</i>	<i>X. pv. phormiicola</i>
<i>X. pv. cannae</i>	<i>X. pv. physalidis</i>
<i>X. pv. carissae</i>	<i>X. pv. plantaginis</i>
<i>X. pv. centellae</i>	<i>X. pv. sesami</i>
<i>X. pv. citrumelo</i>	<i>X. pv. spermacoces</i>
<i>X. pv. clerodendri</i>	<i>X. pv. syngonii</i>
<i>X. pv. convolvuli</i>	<i>X. pv. tardicrescens</i>
<i>X. pv. cordiae</i>	<i>X. pv. thespesiae</i>
<i>X. pv. coriandri</i>	<i>X. pv. thirumalacharii</i>
<i>X. pv. daturae</i>	<i>X. pv. tribuli</i>
<i>X. pv. durantae</i>	<i>X. pv. trichodesmae</i>
<i>X. pv. esculenti</i>	<i>X. pv. uppalii</i>
<i>X. pv. eucalypti</i>	<i>X. pv. vernoniae</i>
<i>X. pv. euphorbiae</i>	<i>X. pv. viegasii</i>
<i>X. pv. fici</i>	<i>X. pv. viticola</i>
<i>X. pv. guizotiae</i>	<i>X. pv. vitiscarnosae</i>
<i>X. pv. gummisudans</i>	<i>X. pv. vitistrifoliae</i>
<i>X. pv. heliotropii</i>	<i>X. pv. vitiswoodrowii</i>
<i>X. pv. ionidii</i>	<i>X. pv. zantedeschiae</i>
<i>X. pv. laureliae</i>	<i>X. pv. zingibericola</i>
<i>X. pv. lawsoniae</i>	<i>X. pv. zinniae</i>

TAB. 1.4 – Les pathovars du genre *Xanthomonas* non attribués à une espèce et placés par défaut dans l'espèce *X. campestris* d'après Young *et al.* (2005)

Chapitre 2

L'hôte et son pathogène : les Brassicacées et *X. campestris*

2.1 Les Brassicacées

Les plantes de la famille des Brassicaceae, anciennement nommée Crucifères, sont des dicotylédones appartenant à la classe des *Magnoliopsida*, sous-classe des *Dillenideae* et à l'ordre des *Capparales*. Elle regroupe entre 3000 et 4000 espèces réparties en 350 genres qui sont généralement des plantes herbacées. Ces genres sont eux-mêmes répartis en 25 tribus (Figure 2.1). Les *Brassicaceae* forment une famille particulièrement importante, aussi bien en terme de nombre d'espèces qui la constitue qu'en terme économique. L'appartenance d'*Arabidopsis thaliana*, la plante modèle, à cette famille et l'importance agronomique des Brassicacées, font que cette famille est particulièrement intéressante à étudier.

2.1.1 L'importance économique des Brassicacées

Les Brassicacées ont offert à l'Homme une très grande diversité d'espèces cultivées pour les usages les plus divers : dans l'alimentation, comme huile,

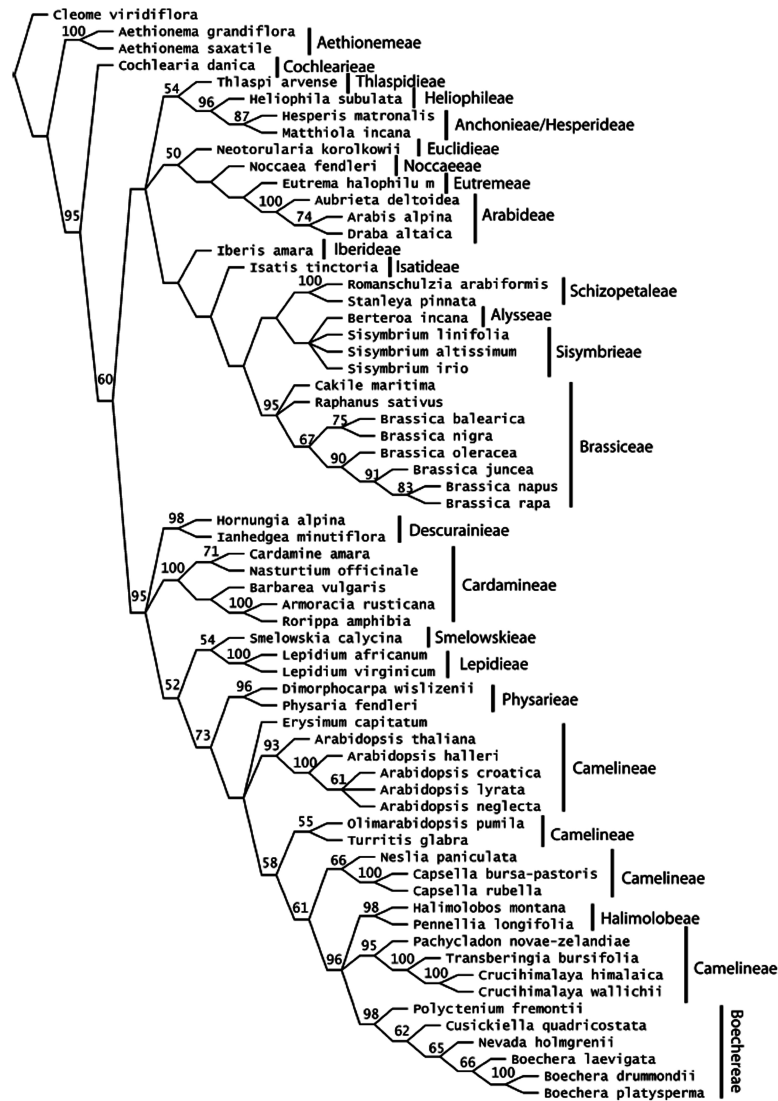


FIG. 2.1 – Relation phylogénétique entre quelques une des tribus appartenant à la famille des *Brassicaceae*, d'après (Bailey *et al.*, 2006).

2.1 Les Brassicacées

fourrage et condiment, et comme espèces ornementales (figure 2.2). Parmi les végétaux produits sur le territoire français, les Brassicacées cultivées représentent une part importante de la production : 73% des oléagineux, 43% racines et tubercules fourragers, 1% des fourrages annuels, 26% des légumes feuillus et à tiges et enfin 8% des bulbes et tubercules (Données agreste, 2005). À l'échelle mondiale, la production de chou est particulièrement importante avec 69,8 millions de tonnes produites; c'est le quatrième légume le plus cultivé derrière la pomme de terre (321 millions de t), la betterave à sucre (242,6 millions de t) et la tomate (125 millions de t) (Données FAO, 2005). Parmi les 80 pays producteurs répartis sur tous les continents, les principaux sont la Chine (34,1 millions de t) et l'Inde (6 millions de t) (Données FAO, 2005). Avec une production de 410 000 t en 2004, le chou-fleur est le type de chou le plus cultivé en France, c'est également le premier légume français pour l'exportation. En effet, en hiver — dans les pays du Nord de l'Europe (tels que le Danemark, l'Allemagne ou le Royaume-Uni) — la production de chou-fleur n'est pas possible et une grande partie de la production française y est exportée (Doré and Varoquaux, 2006). Le Finistère, le Bas-Rhin et le Nord sont respectivement les départements les plus producteurs de chou-fleur, de choux et de choux de Bruxelles (Tableau 2.1).

2005 Production récoltée (en tonnes) — Données Agreste 2005					
Chou-fleur		Choux autres*		Choux de Bruxelles	
Côtes-d'Armor	76 104	Aube	14 400	Lot-et-Garonne	400
Finistère	153 260	Bas-Rhin	61 200	Nord	11 000
Ille-et-Vilaine	31 617	Finistère	16 738	Pas-de-Calais	5 600
TOTAL	347 607	TOTAL	208 579	TOTAL	20 524
Superficie (ha)	24 305	Superficie (ha)	8 535	Superficie (ha)	1 129

* Chou Brocoli, Choux à choucroute, Choux

TAB. 2.1 – Production Française départementale de quelques Brassicacées

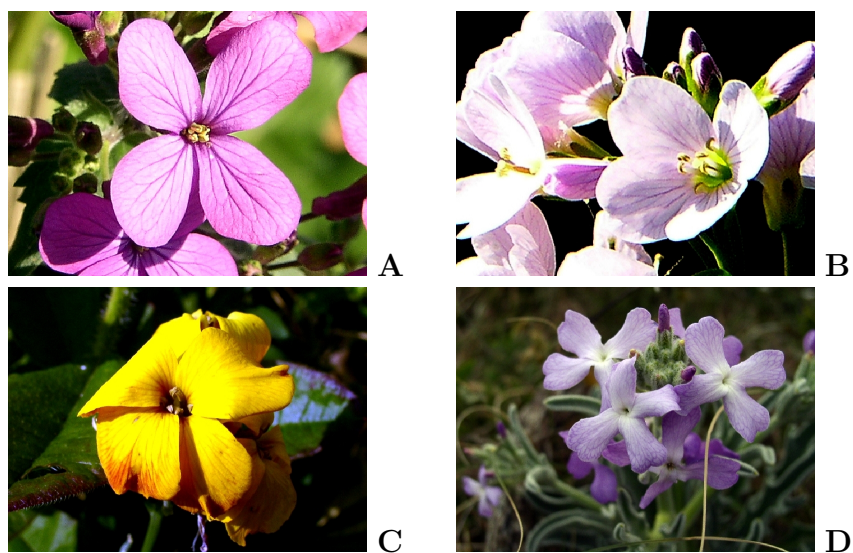


FIG. 2.2 – Brassicacées d'ornement

A) Monnaie-du-Pape (*Lunaria annua*) B) Cardamine des près (*Cardamine pratensis*) C) Giroflée (*Cheiranthus cheiri*) D) Violier (*Mathiola sinuata*)

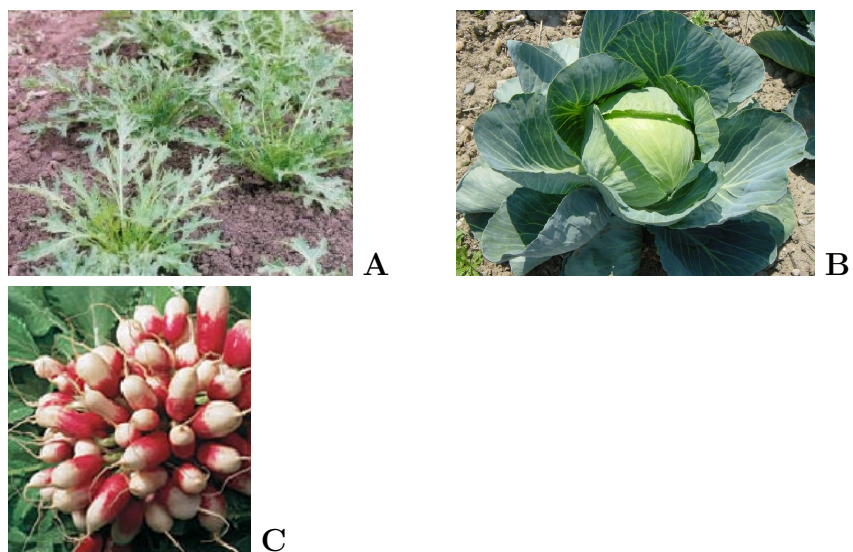


FIG. 2.3 – Quelques Brassicaceae cultivées

A) roquette (*Eruca sativa*) B) chou pommé (*Brassica oleracea*) C) radis (*Raphanus sativus*)

2.2 Origine et botanique de certaines Brassicacées

2.2.1 Une grande plasticité génétique à l'origine de la diversité de cette famille

Parmi les 25 tribus de la famille des Brassicaceae, celle des *Brassiceae* contenant 46 genres et 230 espèces est certainement l'une des plus étudiées en raison de son importance économique (Al-Shehbaz *et al.*, 2006). En effet, cette tribu contient les genres *Brassica*, *Raphanus* et *Eruca* cultivés par exemple comme choux, radis et roquette respectivement (figure 2.3).

Le genre *Brassica* présente probablement le polymorphisme le plus important observé chez les plantes cultivées et est exploité par l'Homme pour des usages très variés. Ce genre fournit l'huile avec le colza et le canola (*B. napus*); les navets et les choux chinois (*B. rapa*; syn. *B. campestris*), les moutardes, la moutarde noire (*B. nigra*), la moutarde indienne ou brune (*Brassica juncea*) et la moutarde éthiopienne (*Brassica carinata*). L'espèce *B. oleracea* fournit à elle seule une très grande variété de légumes dont le chou-fleur (*B. o.* var. *botritis*), le chou pommé (*B. o.* var. *capitata*), le chou-rave (*B. o.* var. *gongylodes*), le chou fourrager (*B. o.* var. *acephala*), les choux de Bruxelles (*B. o.* var. *gemmifera*) et le brocoli (*B. o.* var. *italica*). Cette grande diversité au sein de ce genre a été favorisée par la plasticité de son génome; en effet tous les choux sont inter-fertiles (beaucoup sont auto-incompatibles) et certaines de ces espèces résultent d'un croisement interspécifique spontané très ancien.

En 1935 pour la première fois, le botaniste coréen Nagaharu U énonce une théorie sur l'évolution et les relations de parenté entre certains membres du genre *Brassica* (le triangle de U) (figure 2.4). Selon cette théorie, *B. juncea*, *B. napus*, et *B. carinata* dériveraient d'hybridations interspécifiques entre les trois espèces diploïdes de base *B. rapa*, *B. nigra* et *B. oleracea*

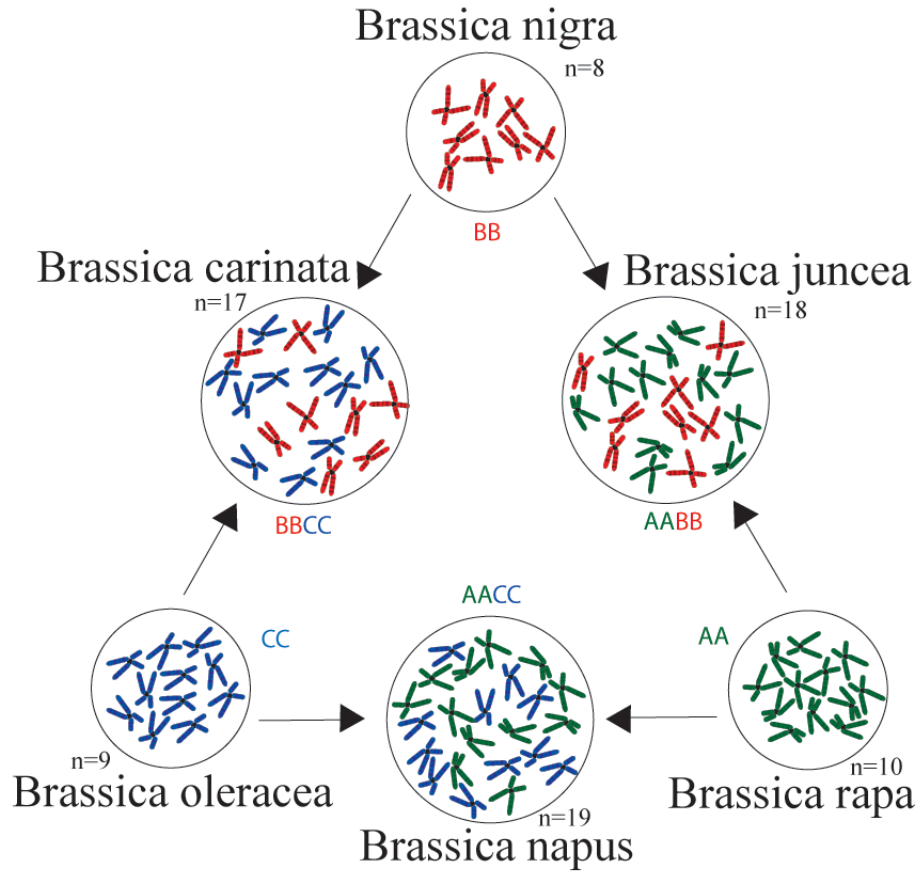


FIG. 2.4 – Le triangle de U représente schématiquement des relations génétiques entre certaines espèces du genre *Brassica*. Les chromosomes de chacun des trois génomes parents sont représentés par des couleurs différentes. (Schéma : M. Jones pour Wikipedia)

(U, 1935). Ce schéma a été confirmé depuis par des analyses moléculaires (Prakash and Hinata, 1980 ; Song *et al.*, 1990 ; Lagercrantz and Lydiate, 1996) Ces hybrides interspécifiques sont appelées amphidiploïdes car leur contenu chromosomique somme ceux des deux génomes parentaux.

2.2.2 Le centre d'origine et de diversification de certaines Brassicacées cultivées

La domestication de la plupart des légumes cultivés a conduit à la sélection de nouvelles plantes, améliorées généralement au regard d'un seul critère. Suivant l'organe consommé, les améliorations portaient sur les graines, les porte-graines, les fruits de certains arbres, les racines de certains légumes. La culture des *Brassica* sp. est une exception notable : les formes ont été sélectionnées pour agrandir les méristèmes végétatifs de l'apex (chou) ou les feuilles axillaires (chou de Bruxelles), pour obtenir des formes avec une prolifération des méristèmes floraux (chou-fleur) ou des boutons floraux (brocoli), mais encore des formes avec des tiges renflées (kohlrabi ou chou-rave) (figure 2.5) (Paterson *et al.*, 2006).

L'origine des *Brassica* est très lointaine, les formes sauvages de *B. nigra* (moutarde noire) — plante indigène de la région Méditerranéenne — et *B. rapa* (la navette) — indigène de l'Europe et de l'Asie — étaient des plantes adventices associées aux cultures des céréales (blé et orge) depuis le début de l'agriculture au Néolithique (Sauer, 1993). Leur dispersion dans le monde s'est généralement faite à travers la contamination de lots de graines de céréales (Sauer, 1993). De nos jours, les Brassicacées sont présentes dans la plupart des régions du monde, plus particulièrement dans les zones tempérées de l'hémisphère Nord, du bassin méditerranéen à l'Asie centrale. Il existe peu de représentants dans l'hémisphère Sud et très peu d'espèces en régions tropicales (Stevens, 2001).

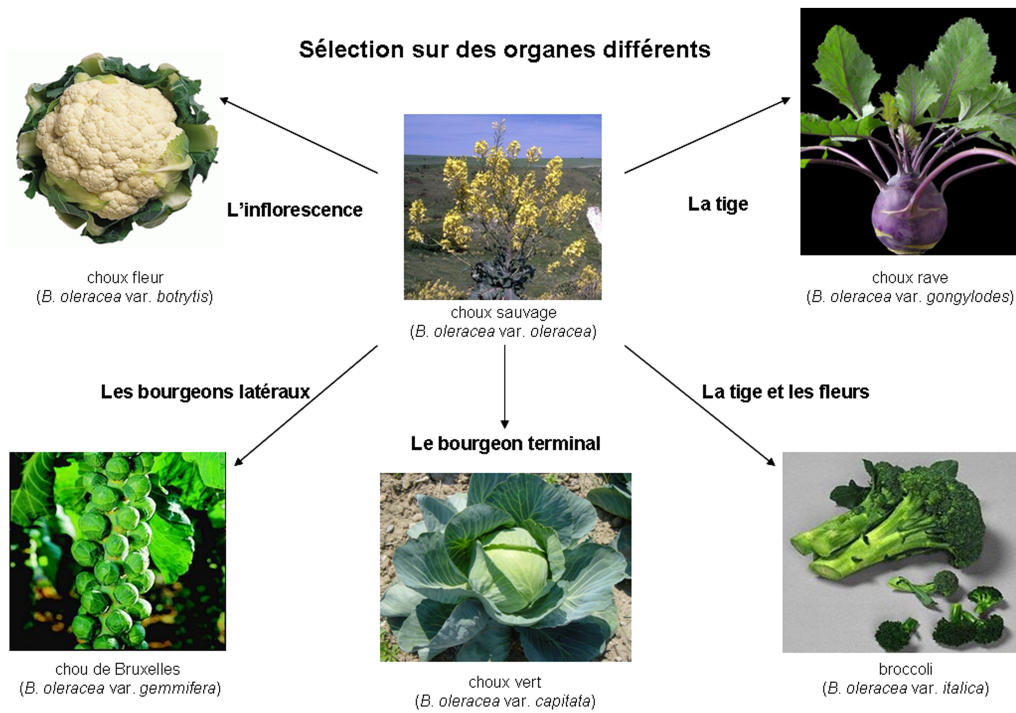


FIG. 2.5 – Sélection sur certains organes pour obtenir différentes variétés de l'espèce *Brassica oleracea*

Origine de la domestication des *Brassica*

Brassica rapa (syn. *B. campestris*) est probablement la première espèce *Brassica* notamment cultivée comme graine pour son huile (Thompson, 1979). Sa domestication s'est faite très tôt et indépendamment dans différentes régions de l'Inde à la Méditerranée il y a 4000 ans (Hancock, 2006). La culture de *B. nigra* a probablement débuté à la même époque en Asie mineure et en Iran où sa forme native est présente (Hancock, 2006).

La domestication de *B. oleracea* comme chou fourrager (*B. o.* var. *acephala*) est quant à elle postérieure à celle de *B. rapa*. Elle serait survenue il y a 2500 ans (Helm, 1963) dans le bassin méditerranéen où sa forme sauvage pousse naturellement le long des côtes méditerranéennes et atlantiques, de la Grèce à l'Angleterre (Hancock, 2006). Les variétés que nous connaissons actuellement comme le chou-fleur et le brocoli ne sont pas très anciennes — elles sont clairement référencées depuis 500 ans environ (Hancock, 2006). Leur culture s'est répandue depuis le nord de l'Europe pour le chou-fleur et depuis l'Est méditerranéen pour le brocoli (Hancock, 2006). Le chou de Bruxelles est le plus récemment apparu : il a été décrit pour la première fois en 1750 et est devenu très populaire depuis le XIX^{ème} siècle (Pitrat and Foury, 2003). Actuellement les cultivars de *B. oleracea* sont sélectionnés pour la solidité de leur tête, pour leur résistance aux pathogènes, aux méthodes de récolte mécanique et au stockage (Pitrat and Foury, 2003).

L'origine de la domestication du colza et du rutabaga, les hybrides *B. napus*, n'est pas clairement établie bien qu'elle ne se soit pas faite avant le Moyen Âge (Hancock, 2006). À cette époque, cette espèce est apparue spontanément dans les jardins du pourtour du bassin méditerranéen, où le chou était cultivé pour la consommation à côté de la navette servant à produire de l'huile d'éclairage. Le colza aurait été sélectionné comme navette capable de produire plus d'huile et le rutabaga comme un navet produisant des racines plus volumineuses (Doré and Varoquaux, 2006). L'hybride issu de *B. nigra* et *B. rapa*, *B. juncea* (moutarde indienne ou brune), serait apparu dans le



FIG. 2.6 – *Arabidopsis thaliana*

Sud-Ouest Asiatique et en Inde (Sauer, 1993) et serait cultivé simultanément en Inde, en Chine et dans le Caucase (Hancock, 2006). Outre son utilisation comme épice, commune aux moutardes, la moutarde brune est également cultivée pour produire de l'huile à partir de ses graines et comme légume pour ses feuilles (Hemingway, 1995). *B. carinata* (moutarde éthiopienne) est originaire d'Ethiopie, où les deux espèces sauvages parentes sont communes dans cette région (Hancock, 2006).

***Arabidopsis thaliana* : la plante modèle des biologistes**

Outre l'intérêt porté aux *Brassica* et aux Brassicacées en général en raison de leur importance économique et de leur grande diversité, cette famille est particulièrement étudiée pour *Arabidopsis thaliana*, la plante modèle des biologistes.

Arabidopsis thaliana — Arabette des Dames — est une petite espèce herbacée appartenant à la famille des Brassicacées (Figure 2.6), décrite pour la première fois par Johannes Thal au XVI^{ème} siècle et originaire de l'Eurasie (Al-Shehbaz *et al.*, 2006). Cette espèce est devenue depuis une vingtaine d'an-

2.3 Les caractéristiques générales

nées la plus utilisée dans les laboratoires ; elle fut également la première espèce végétale à avoir son génome séquencé (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). L'arabette possède le plus petit génome végétal connu et présente de nombreux avantages tels que sa culture aisée en laboratoire, sa rapidité de développement et sa prolificité. Cette plante modèle est notamment utilisée pour comprendre la biologie des végétaux et les mécanismes de l'interaction entre la plante et les pathogènes (Daniels, 1992 ; Parker *et al.*, 1993).

Le genre *Brassica* a la particularité d'être le genre le plus proche d'*Arabidopsis*, partageant plus de 85% d'identité nucléotidique (Cavell *et al.*, 1998). Cette relation de parenté a grandement facilité les approches de génomique comparée dans le cadre de programmes d'amélioration végétale pour définir les traits à sélectionner (Lan and Paterson, 2000 ; O'Neill and Bancroft, 2000). Plus précisément, ces deux genres auraient divergé d'un même ancêtre commun il y a 14,5 à 20,4 millions d'années (Yang *et al.*, 1999), depuis cette divergence le génome des *Brassica* sp. a triplé (Cavell *et al.*, 1998).

2.3 Les caractéristiques générales

2.3.1 L'appareil végétatif

Les Brassicacées sont des plantes herbacées, très rarement sous-arbrisseaux ou arbustes. Les plantes sont annuelles ou assez couramment bisannuelles, l'appareil végétatif se développant la première année, et l'appareil reproducteur l'année suivante. Le feuillage est alterne à stipules réduits et caducs, voire absents. Pour leur floraison, une période de vernalisation est généralement nécessaire (Watson and Dallwitz, 1992 ; Stevens, 2001).

2.3.2 Les fleurs : l'appareil reproducteur

L'ancien nom de crucifères de la famille provient de la disposition caractéristique en croix des quatre pétales, rendant cette famille particulièrement

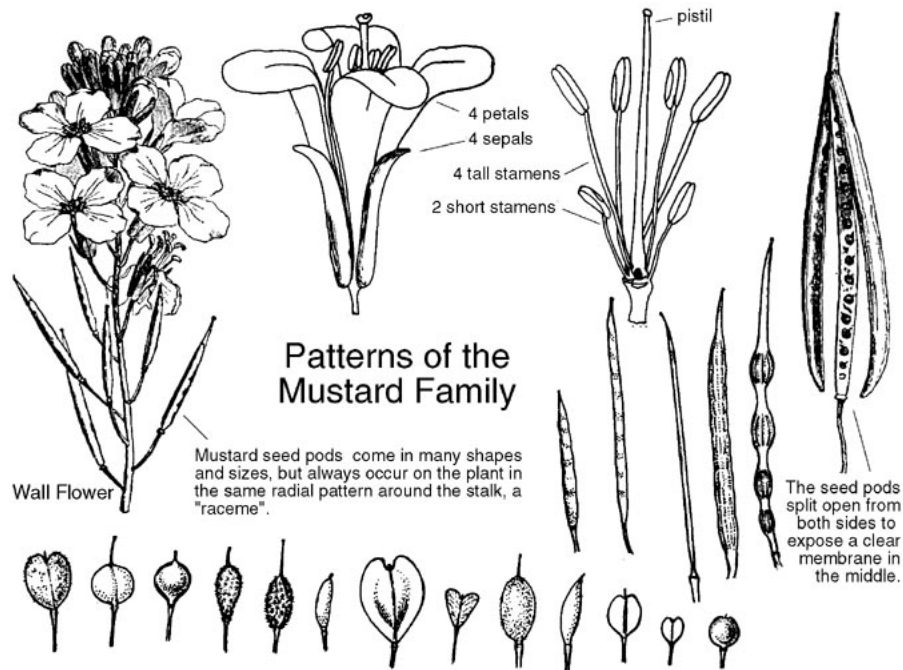


FIG. 2.7 – Représentation d'une inflorescence de brassicacée
Source : *Wildflowers & Weeds*

facile à identifier (Stevens, 2001). Les fleurs sont bisexuées et assemblées en grappes. Elles sont composées de quatre sépales, quatre pétales, six étamines dont deux plus courtes, un androcée didyname, deux carpelles soudés avec des placentas pariétaux reliés par une membrane séparant l'ovaire (Chalandre, 2000) (figure 2.7).

2.3.3 Les fruits

Le fruit nommé silique est typique des Brassicacées. Il possède deux valves séparées par une cloison transversale. À maturité, les valves se fendent au bord de la cloison puis tombent. Les graines restent fixées au cadre qui entoure la cloison, puis finissent par se détacher. (Watson and Dallwitz, 1992) (figure 2.7).

2.4 Les maladies et ravageurs des Brassicacées

Les principaux problèmes liés à la production des Brassicacées légumières sont les ravageurs et les maladies. Ils peuvent non seulement altérer la qualité des légumes — les rendant inappropriés à la vente sur le marché du frais et à la transformation — mais aussi aller jusqu'à détruire la quasi-totalité de la production en plein champ.

2.4.1 Les ravageurs et les maladies fongiques des Brassicacées cultivées

Les ravageurs sont très dommageables aux Brassicacées maraîchères. Ils sont responsables de pertes économiques importantes car ils réduisent la qualité marchande des légumes (Figure 2.8). Ils causent généralement des défoliations importantes ou une déformation de la pomme et ralentissent leur croissance. Lorsque les tissus sont endommagés les plants deviennent plus vulnérables aux infections fongiques et bactériennes secondaires. Les plants attaqués sont bien souvent non commercialisables (Walker, 2005).

Ces ravageurs sont également vecteurs de maladies, notamment de virus. On rencontre sur les Brassicacées deux viroses très importantes, la Mosaïque du Navet (*Turnip mosaic virus*, TuMV) et la Mosaïque du Chou-fleur (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV), transmises par les pucerons. Trois virus transmis par coléoptères sont également rapportés : la Mosaïque jaune du Navet (*turnip yellow mosaic virus*, TYMV), le virus de la Rosette du Navet (*Turnip rosette virus*, TRV) et le virus de la Mosaïque du Radis (Messiaen *et al.*, 1991).

Les pathogènes fongiques (Tableau 2.2) sont de redoutables ennemis de la production des Brassicacées. Ils peuvent attaquer les plantes tout au long de leur croissance au champ mais aussi lors de l'entreposage. Généralement



FIG. 2.8 – Les ravageurs des brassicacées cultivées : A) Le Puceron du chou *Brevicoryne brassicae*; B) La Piéride du chou (*Pieris rapae*); C) La Fausse teigne des brassicacées (*Plutella xylostella*); D) L'Arpenteuse du chou (*Trichoplusia ni*); E) L'Arpenteuse de la luzerne (*Autographa californica*); F) La Mouche du chou (*Delia radicum*); G) L'Altise (*Phyllotreta* spp.); H) La Cécidomyie du chou (*Contarinia nasturtii*); I) Les Thrips (*Thrips tabaci*).

2.4 Les maladies et ravageurs des Brassicacées

les plantes attaquées sont non commercialisables, que ce soit pour le marché frais ou pour la transformation (Wukasch, 1990 ; Walker, 2005).

Les maladies fongiques	Les pathogènes
La nécrose du collet	<i>Leptosphaeria maculans</i> , <i>Phoma lingam</i>
La hernie du chou	<i>Plasmodiophora brassicae</i>
Le mildiou	<i>Peronospora parasitica</i>
La jaunisse fusarienne	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.
La tache grise et tache noire	<i>Alternaria brassicae</i> et <i>A. brassicola</i>
La fonte des semis, tige noire	<i>Rhizoctonia solani</i>
La pourriture sclérotique	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
La pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i>

TAB. 2.2 – Les maladies fongiques des Brassicacées cultivées d’après Wukasch (1990) ; Collin and Serpeille (2000) et Walker (2005).

2.4.2 Les maladies bactériennes des Brassicacées cultivées

Plusieurs maladies bactériennes sont également responsables de pertes importantes dans la production de Brassicacées cultivées.

La tache bactérienne (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*)

L’agent pathogène, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, attaque principalement le chou-fleur mais sa gamme d’hôtes comprend également le brocoli et le chou de Bruxelles. Les autres *B. oleracea* sont moins sensibles (Messiaen *et al.*, 1991). Les symptômes caractéristiques de la maladie sont de petites taches brunes (1 mm) de forme irrégulière et entourées d’un halo jaune sur feuilles. À un stade avancé de la maladie, les petites taches fusionnent en de larges plages brunes à bordure jaune qui se déchirent facilement, donnant à la plante un aspect déchiqueté (figure 2.9) (Wukasch, 1990).



FIG. 2.9 – Symptômes de tache bactérienne provoqués par *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* sur feuilles de chou

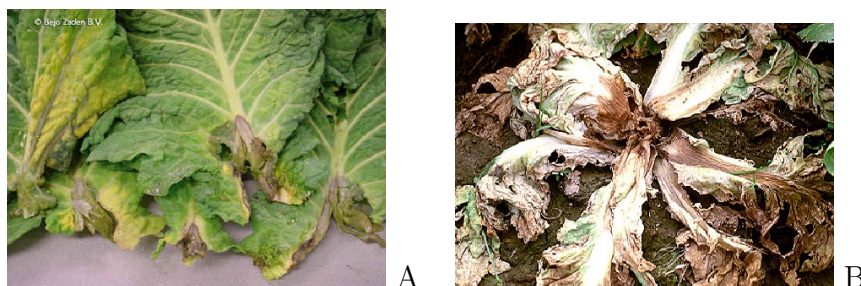


FIG. 2.10 – Symptômes de pourriture molle causés par *Erwinia* spp. sur chou (A) et chou chinois (B).



FIG. 2.11 – Symptômes de nervation noire induite par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sur chou

La pourriture molle (*Erwinia* spp.)

La pourriture molle est causée par *Erwinia carotovora*. Les bactéries envahissent les tissus végétaux par les blessures dues aux insectes, aux pratiques culturales, et aux intempéries. Elles décomposent alors rapidement les tissus en une masse molle, visqueuse, qui dégage une odeur nauséabonde. La maladie peut occasionner des pertes aussi bien en entrepôt, durant le transport que dans les champs (figure 2.10) (Wukasch 1990).

La nervation noire (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)

L'une des plus graves maladies bactériennes des Brassicacées cultivées est sans aucun doute la nervation noire causée par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (figure 2.11) (Williams, 1980).

2.5 Les bactérioses des Brassicacées causées par des *X. campestris*

2.5.1 Les six maladies provoquées par *X. campestris*

Les maladies vasculaires

Trois bactérioses vasculaires dues à des *X. campestris* sont recensées sur les Brassicaceae. Il s'agit de la nervation noire due à *X. campestris* pv. *campestris*, la nervation noire de la barbarée due à *X. campestris* pv. *barbareae* et le dépérissement des giroflées due à *X. campestris* pv. *incanae*.

C'est Pammel en 1895 qui décrit le premier les symptômes d'une bactériose sur une Brassicacée, le rutabaga (*B. napus* var. *napobrassica*). Il s'agit de lésions jaunes en marge des feuilles accompagnées de nervures noires (figure 2.12). À partir de ces lésions, il isole des bactéries mobiles produisant des colonies de couleur jaune, qu'il baptise *Bacillus campestris* (Pammel, 1895),



FIG. 2.12 – Des feuilles accompagnées de nervures noires provoquées par *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

actuellement connues sous le nom *X. c.* pv. *campestris*. La gamme d'hôtes du pathogène s'étend à toute la famille des Brassicacées (Bradbury, 1986).

En 1941, une maladie similaire est rapportée sur les Brassicacées sauvages ou adventices, notamment la barbarée vulgaire (*Barbarea vulgaris*) (Burkholder, 1941). L'auteur montre que le pathogène est très proche de *X. c.* pv. *campestris* au niveau de la morphologie mais ne provoquerait que des symptômes sur son hôte d'isolement et très peu, voire aucun, sur chou-fleur (Bradbury, 1986). Ce pathogène est actuellement connu sous le nom *X. c.* pv. *barbareae*.

Une troisième maladie a été décrite sur giroflées, dont l'origine initiale des symptômes était attribuée à *X. c.* pv. *campestris* (Hall, 1900 ; Faber 1907). Cependant, bien que ressemblant morphologiquement à *X. c.* pv. *campestris* le pathogène des giroflées en diffère dans son pouvoir pathogène (Kendrick and Baker, 1942). Ce pathogène provoque un flétrissement des feuilles ainsi que des nécroses sur la tige (figure 2.13) (Kendrick and Baker, 1942). Bradbury (1986) précise que la gamme d'hôtes de *X. c.* pv. *incanae* est restreinte aux giroflées aussi bien *Matthiola* sp. que *Cheiranthus* sp.



FIG. 2.13 – La maladie du dépérissement des giroflées induite par *X. campestris* pv. *incanae*

Les maladies du parenchyme

Au moins trois bactérioses entraînant des symptômes sur le parenchyme de Brassicacées sont décrites dans la littérature. Il s'agit de la maladie des taches foliaires du chou-fleur due à *X. campestris* pv. *aberrans* (Bradbury, 1986), de la maladie des taches foliaires du raifort due à *X. campestris* pv. *armoraciae* (McCulloch, 1929) et de la maladie des taches foliaires du radis consécutive aux attaques de *X. campestris* pv. *raphani* sur radis et navets (White 1930).

En 1926, une nouvelle maladie est observée sur des raiforts dans une serre de Washington. Les feuilles de raifort sont maculées de taches et de nombreuses colonies bactériennes jaunes sont isolées de ces taches (McCulloch, 1929). La bactérie semble avoir de nombreuses caractéristiques en commun avec *X. c.* pv. *campestris* hormis sa réaction particulière avec l'hôte. McCulloch (1929) explique que ce pathogène, actuellement connu sous le nom de *X. campestris* pv. *armoraciae*, a la particularité de ne pas provoquer de maladie vasculaire comme *X. c.* pv. *campestris* mais plutôt une maladie du parenchyme. Les premiers symptômes de la maladie sont l'apparition de petites taches vert-foncé sur la face inférieure des feuilles. À un stade plus avancé,

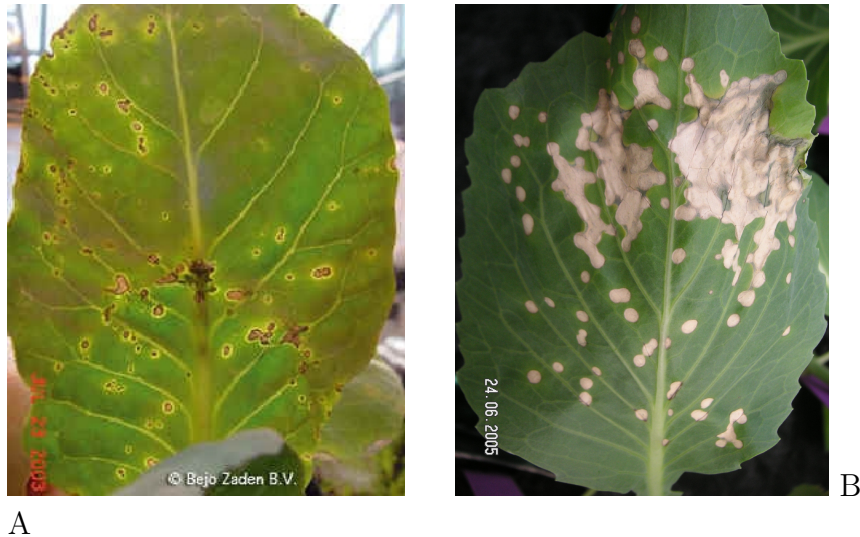


FIG. 2.14 – Maladie des taches foliaires sur brassicacées provoquées par *X. campestris* pv. *armoraciae* (A), et *X. campestris* pv. *raphani* (B).

les taches deviennent visibles sur la surface supérieure des feuilles (figure 2.14.A) (McCulloch, 1929). Sur chou et chou-fleur, ce pathogène - *X. c.* pv. *armoraciae* - est nettement moins agressif ; quelques symptômes typiques sont également observés sur giroflées (*Matthiola incana*) et sur haricots (*Phaseolus* spp.).

La même année en Inde, une autre bactériose provoquant des taches foliaires a été rapportée sur radis et navet (White and Gardner, 1929). Le pathogène, *X. campestris* pv. *raphani*, cause sur les feuilles des taches circulaires irrégulières noires qui deviennent par la suite marron clair et le plus souvent auréolées d'une zone jaunâtre gorgée d'eau. Bien souvent, lorsque les lésions s'étendent, le pétiole se déchire (White 1930). White et Gardner (1929) rapportent que ce pathogène provoque des symptômes similaires sur chou, chou-frisé, chou-fleur, chou de Bruxelles mais également sur tomates, tabacs et poivrons. White (1930) montre dans ses travaux que ce pathogène du radis est différent de *X. c.* pv. *campestris* car il ne provoque pas d'infec-

tion vasculaire. Il diffère également de *X. c. pv. armoraciae* du fait de sa plus large gamme d'hôtes (figure 2.14.B) (White, 1930).

Bradbury (1986) rapporte l'existence d'un variant de *X. c. pv. campestris* nommé *X. c. pv. aberrans*. Knösel (1961) explique que ce pathogène est beaucoup plus agressif sur chou-fleur et qu'il a tendance à provoquer de nombreuses taches nécrotiques plutôt que de la nervation noire ; il nomme cette bactériose la maladie des taches foliaires du chou-fleur.

2.6 Les caractéristiques cellulaires des *Xanthomonas*

2.6.1 La morphologie de la bactérie

Comme toutes les bactéries du genre *Xanthomonas*, les *X. campestris* sont des bacilles à Gram négatif de 0,4 à 0,6 μm de large et 0,8 à 2 μm de long. Elles se retrouvent le plus souvent seules ou par paires, occasionnellement en chaînette. Leur métabolisme respiratoire est aérobie stricte. Les bactéries du genre *Xanthomonas* sont catalase positive, oxidase négative ou faiblement positive. Elles ne produisent pas d'inclusion de poly β -hydroxybutyrate, ne réduisent pas les nitrates, ni ne dénitrifient. Les bactéries sont mobiles par un flagelle polaire (figure 2.15) (Saddler and Bradbury, 2005).

Les *Xanthomonas* sont riches en acides gras et les lipides comptent pour 20% du poids de la bactérie (Lechevalier and Lechevalier, 1988). Trois acides gras 11 :0 iso, 11 :0 iso 3OH et 13 :0 iso 3OH sont caractéristiques du genre et ne sont pas détectés chez d'autres bactéries phytopathogènes (Yang *et al.* 1993).

Bien que certaines souches puissent être non pigmentées (comme *X. axonopodis pv. manihotis*), les colonies sont la plupart du temps jaunes (figure 2.16) sur milieu YDC (*yeast extract dextrose carbonate*). Le pigment intervenant dans cette coloration est la xanthomonadine (figure 2.17). Il peut être

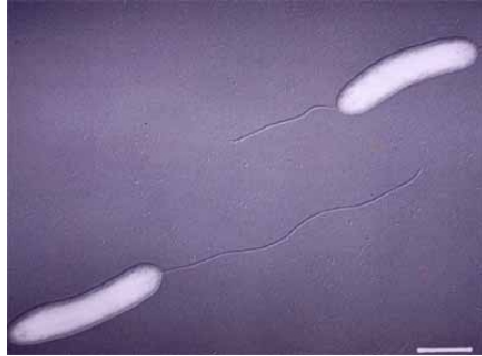


FIG. 2.15 – Bactérie du genre *Xanthomonas* mobile par un flagelle polaire

nécessaire pour la survie épiphyte de la bactérie (Poplawsky *et al.*, 2000), et aurait également un rôle de protection contre les dommages photo-biologiques (Jenkins and Starr, 1982).

La bactérie produit des polysaccharides extracellulaires (EPS), dont le constituant principal est le xanthane (figure 2.18). Ils donnent un aspect mucoïde à la colonie. La production des EPS est associée à la virulence chez *X. campestris* (Daniels *et al.*, 1984; Poplawsky and Chun, 2002; Shaw *et al.*, 1988). Ces EPS jouent un rôle important dans la tolérance à la dessiccation (Wilkinson 1958; Roberson and Firestone, 1992). En association avec les xanthomonadines ils sont importants pour la survie du pathogène sur les feuilles et pour l'infection de l'hôte (Poplawsky and Chun, 1998). Le xanthane est une gomme utilisée en agroalimentaire, en cosmétique, dans l'industrie pétrolière et le bâtiment, comme agent viscosant et permettant de stabiliser les émulsions. Il est autorisé dans l'industrie alimentaire aux Etats-Unis depuis 1969 et dans l'Union Européenne depuis 1980 sous le nom E415 (Becker *et al.*, 1998).



FIG. 2.16 – Colonies bactériennes du genre *Xanthomonas* jaunes et muqueuses sur un milieu riche gélosé

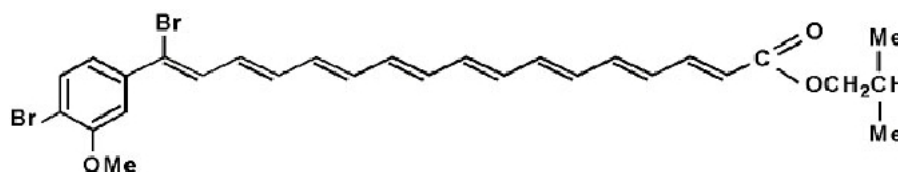


FIG. 2.17 – Structure de la xanthomonadine (Andrewes et al., 1976). La xanthomonadine est exclusivement produite par les bactéries du genre *Xanthomonas*.

La physiologie de la bactérie

L'optimum de croissance des *Xanthomonas* se situe à des températures allant de 25 à 30°C et à un pH voisin de 6,5. Ils ne peuvent se développer à un pH inférieur à 4,5 et à des températures inférieures à 4°C. Seul *X. populi* est incapable de se multiplier à une température supérieure à 23°C. Les *Xanthomonas* sont chimioorganotrophes, c'est-à-dire qu'ils puisent leur énergie à partir de composés organiques. Les milieux de culture doivent contenir des minéraux, du nitrate d'ammonium, une source de carbone telle que le glucose, et des suppléments en acides aminés. La plupart du temps, le glutamate et la méthionine sont nécessaires à la croissance bactérienne (Saddler

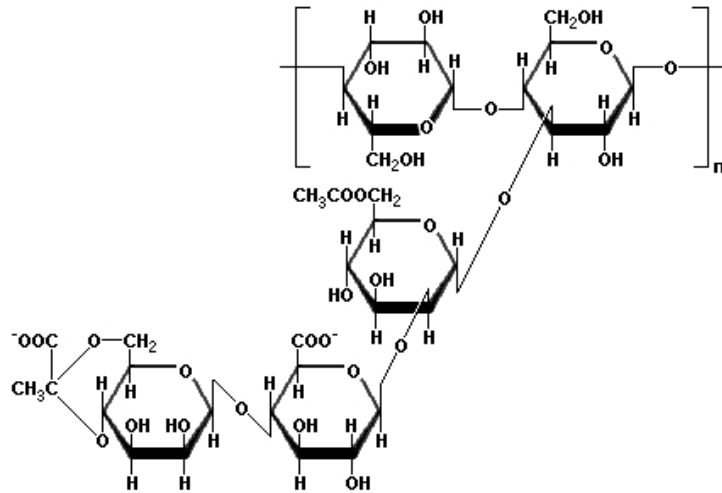


FIG. 2.18 – Unité structurale de la gomme xanthane.

Le xanthane est un hétéropolysaccharide produit la bactérie *Xanthomonas campestris*. Sa structure est constituée d'une chaîne principale de β -D-glucoses liés en $\beta(1-4)$. Une molécule de glucose sur deux porte une chaîne latérale trisaccharidique composée d'un α -D-mannose, d'un acide β -D-glucuronique et d'un β -D-mannose terminal. Le résidu mannose est généralement acétylé. Environ 30% des résidus mannose terminal portent un groupement pyruvate.

and Bradbury, 2005). La multiplication des cellules est inhibée par 6% de NaCl, 30% de glucose, 0,01% d'acétate de plomb, du vert de méthyle ou de la thionine, et par 0,1% de chlorure de triphenyl tetrazolium (Saddler and Bradbury, 2005).

Les génomes séquencés pour l'espèce *X. campestris*

Actuellement, les génomes de six bactéries appartenant au genre *Xanthomonas* sont séquencés : *X. axonopodis* pv. *citri* souche 306 (da Silva *et al.*, 2002), *X. campestris* pv. *campestris* souche ATCC 33913 (da Silva *et al.*, 2002), *X. campestris* pv. *campestris* souche 8004 (Qian *et al.*, 2005), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* souche 85-10 (Thieme *et al.*, 2005), *X. oryzae* pv.

2.6 Les caractéristiques cellulaires des *Xanthomonas*

oryzae souche KACC10331 (Lee *et al.*, 2005) et *X. oryzae* pv. *oryzae* souche MAFF 311018 (Ochiai *et al.*, 2005). Trois autres génomes sont en cours de séquençage : *X. oryzae* pv. *oryzicola* souche BLS256, *X. campestris* pv. *armoraciae* souche 756C et *X. albilineans* souche GPE PC73.

Le génome du genre *Xanthomonas* est composé d'un chromosome unique circulaire, dont le pourcentage en G + C varie entre 63 et 69,7% (Saddler and Bradbury, 2005). La taille des génomes séquencés est relativement similaire au sein du genre *Xanthomonas* allant de 4831739 paires de bases (pb) pour la souche BLS256 *X. oryzae* pv. *oryzicola* BLS256 à 5178466 pb pour *X. a.* pv. *vesicatoria* souche 85-10. Les régions codantes représentent entre 79 et 87% de la taille du chromosome (Tableau 2.3).

La séquence des génomes de deux souches appartenant à l'espèce *X. campestris* est actuellement disponible et celle d'une troisième souche le sera très prochainement (Tableau 2.3). Les deux souches de *X. c.* pv. *campestris* (Xcc 8004 et ATCC 33913) ont un génome très conservé, la majorité des séquences codantes potentielles sont identiques (Quian *et al.* 2005). Plusieurs réarrangements significatifs ont été observés : ils seraient dus à des événements de recombinaison (Quian *et al.* 2005). L'un de ces réarrangements correspond à une inversion d'une partie du génome. Quian *et al.* (2005) et da Silva *et al.* (2002) mettent également en évidence la présence d'un grand nombre d'éléments transposables distribués le long du génome, 115 chez Xcc 8004 et 109 chez ATCC 33913. Ils auraient été acquis par transferts horizontaux.

	<i>X. a. pv.</i> <i>citri</i>	<i>X. a. pv.</i> <i>vesicatoria</i>	<i>X. o. pv.</i> <i>oryzae</i>	<i>X. o. pv.</i> <i>oryzae</i>	<i>X. o. pv.</i> <i>oryzae</i>	<i>X. o. pv.</i> <i>oryzicola</i>	<i>X. c. pv.</i> <i>campestris</i>	<i>X. c. pv.</i> <i>campestris</i>	<i>X. c. pv.</i> <i>armoraciae</i>
bactérie	<i>citri</i>	<i>vesicatoria</i>	<i>oryzae</i>	<i>oryzae</i>	<i>oryzae</i>	<i>oryzicola</i>	<i>campestris</i>	<i>campestris</i>	<i>armoraciae</i>
souches	306,	85-10	MAFF311018	KACC10831	BLS256	ATCC3913	8004	756C	
Ref. de la séquence	NC_003919	NC_007508	NC_007705	NC_006834	-	NC_003902	NC_007086	Taxon ID 316273	(ref. TIGR)
Longueur (pb)	5 175 554	5 178 466	4 940 217	4 941 439	4 831 739	5 076 188	5 148 708	4 941 214	
GC %	64%	64%	63%	63%	64%	65%	64%	65%	
Régions codantes	85%	87%	83%	79%	86%	84%	84%	85%	
Séquences codantes	4312	4487	4372	4637	4626	4181	4273	4534	
ARNs de structure	62	58	59	60	60	61	61	64	
Séquence d'insertion	108	58	386	207	ND	109	115	ND	
Publications	(a)	(b)	(c)	(d)	(f)	(a)	(e)	(f)	
Plasmide	pXAC33, pXAC64	pXCV2, pXCV19, pXCV38, pXCV183	0	0	0	0	0	0	

(a) da Silva *et al.*, 2002; (b) Thieme *et al.*, 2005; (c) Ochiai *et al.*, 2005; (d) Lee *et al.*, 2005; (e) Qian *et al.*, 2005; (f) En cours d'annotation

TAB. 2.3 – Informations générales sur les génomes séquencés ou en cours de séquençage de souches appartenant au genre *Xanthomonas*.

2.6.2 La classification intraspécifique des *X. campestris*

L'espèce et ses pathovars

Depuis sa découverte, le pathogène causant la nervation noire — *X. c. pv. campestris* — était le seul représentant de l'espèce *X. campestris* (Bradbury, 1986). Comme nous l'avons vu précédemment, les pathogènes du genre *Xanthomonas* qui ne figuraient pas dans l'*Approved List* de 1980 (Skerman *et al.*, 1980) ont perdu leur nomenclature et ont été placés par défaut au sein de l'espèce *X. campestris*. Celle-ci s'est enrichie de plus de 140 pathovars n'ayant pas de relation de parenté particulière. Ce n'est qu'en 1995 que Vauterin *et al.* lui restaurent son statut d'espèce à part entière. Les hybridations ADN-ADN entre les individus du genre montrent que les *Xanthomonas* dont l'écologie est associée aux Brassicacées forment une espèce telle que la définissent Wayne *et al.* (1987). L'espèce *X. campestris* est désormais restreinte à six pathovars provoquant des maladies sur Brassicacées : *X. c. pv. aberrans* et *X. c. pv. campestris* isolés du chou (*Brassica*), *X. c. pv. armoraciae* isolé du raifort (*Armoracia lapathifolia*), *X. c. pv. barbareae* isolé de la barbare vulgaire (*Barbarea vulgaris*), *X. c. pv. raphani* isolé du radis (*Raphanus sativus*) et *X. c. pv. incanae* isolé de la giroflée (*Matthiola incana*).

Au sein de l'espèce *X. campestris*, la classification en pathovars est surtout basée sur l'hôte d'isolement de la bactérie et ne prend que peu en compte la symptomatologie des maladies qu'elles engendrent ou la gamme d'hôtes. Les pathovars de l'espèce *X. campestris* ont une gamme d'hôtes plus large que celle spécifiée par leur nom. De nombreux auteurs ont des doutes sur la synonymie de certains de ces pathovars, notamment des pathovars *aberrans* et *campestris*, et des pathovars *armoraciae* et *raphani* (Alvarez *et al.*, 1994; Vauterin *et al.*, 1995; Vicente *et al.*, 2001, 2006).

	Plante		
		R	r
Pathogène			
Avr		Incompatibilité	Compatibilité
avr		Compatibilité	Compatibilité

R : allèle de résistance du gène; r : allèle de sensibilité du gène; Avr : gène d'avirulence, allèle d'avirulence; avr : gène d'avirulence, allèle de virulence; Compatibilité = maladie; Incompatibilité = résistance;

TAB. 2.4 – Modèle génétique de l'interaction gène-pour-gène d'après Flor, (1971).

La notion de race au sein de l'espèce *X. campestris*

Lorsque la plante est attaquée par un pathogène, elle tente de contenir sa progression dans ses tissus. Dans la majorité des cas, cette réponse aboutit à l'élimination du pathogène et la plante est alors dite résistante. Cette résistance se traduit souvent par le développement d'une réaction hypersensible (HR) qui se manifeste sous la forme d'une nécrose non évolutive localisée aux tissus mis en contact avec l'agent pathogène. Cette interaction entre la plante et le pathogène se caractérise par l'action conjointe de deux gènes dominants (tableau 2.4) (Flor, 1971) : le gène de résistance (R) chez la plante et le gène d'avirulence (Avr) spécifique correspondant chez l'agent pathogène. Un cultivar portant un gène de résistance R est résistant à une souche appartenant à une race portant le gène d'avirulence Avr spécifique correspondant (Ellis, 2000). Lorsque les deux gènes sont présents et fonctionnels, l'interaction est dite incompatible et se traduit par une HR. Lorsque l'un ou l'autre des gènes est absent ou non fonctionnel, l'interaction est dite compatible et la maladie se développe.

X. c. pv. campestris et *X. c. pv. raphani* ont été divisés en respectivement six et trois races, provoquant des réactions différentes sur certaines variétés

2.6 Les caractéristiques cellulaires des *Xanthomonas*

	Gènes d'avirulence (A) / Races					
	1	2	3	4	5	6
	A1	...	A1	A1 ? ^a
	...	A2
	...	A3	A3	...	A3	...
	A4
Cultivars ou accessions de Brassicacées	Gènes de Résistance (R)					
Wirosa F1 (<i>B. oleracea</i>)	+ ^b
Navet Hybride Just Right (<i>B. rapa</i>)	R4	...	+ + + - ^c + +
Navet Seven top (<i>B. rapa</i>)	...	R2	...	R4	...	+ - + - + +
PI 199947 (<i>B. carinata</i>)	R1	R4 ? ^d	...	- + - -/(+) ^e + +
Moutarde de Floride (<i>B. juncea</i>)	R1	R4 ?	?	- + - - (+) +
Miracle F1 (<i>B. oleracea</i>)	R3	+ - - + - +

^a A1 ? présence possible du gène d'avirulence A1 (Vicente *et al.*, 2001)
^b + interaction compatible (maladie)
^c - interaction incompatible (résistance)
^d R4 ? présence possible du gène de résistance R4 (Vicente *et al.*, 2001)
^e (+) peu pathogène

TAB. 2.5 – Modèle gène pour gène pour expliquer la relation entre des cultivars de Brassicacées et les races de *X. c. pv. campestris* d'après Vicente *et al.* (2001)

	Gènes de Résistance (R)	Gènes d'avirulence (A) / Races		
		1	2	3
Cultivars ou accessions de Brassicacées		A1	A2	A1
Wirosa F1 (<i>B. oleracea</i>)	...	+ ^a	+	+
Navet Hybride Just Right (<i>B. rapa</i>)	R1	- ^b	+	+
Moutarde de Floride (<i>B. juncea</i>)	R1	-	+	+
Miracle F1 (<i>B. oleracea</i>)	R2	+	-	+

^a + interaction compatible (maladie)
^b - interaction incompatible (résistance)

TAB. 2.6 – Modèle gène pour gène pour expliquer la relation entre des cultivars de Brassicacées et les races de *X. c. pv. raphani* d'après Vicente *et al.* (2001)

de Brassicacées (Tableau 2.5) (Kamoun *et al.*, 1992; Vicente *et al.*, 2001, 2006) (tableau 2.6). Les races 1 et 4 de *X. c. pv. campestris*, races les plus communes, sont à l'origine de 90% des cas de nervation noire dans le monde (Vicente *et al.*, 2001). L'existence de races chez ces deux pathovars a permis de mettre au point un modèle gène pour gène pour expliquer l'interaction entre les cultivars et les races. Ce modèle est indispensable pour orienter la recherche de cultivars résistants. Il n'est cependant pas figé, ce qui est dû à l'existence potentielle d'autres races qui n'ont pas encore été identifiées à ce jour (Castañeda *et al.* 2005).

2.6.3 Le cycle infectieux de *X. campestris* (figure 2.19)

La semence ou la dissémination à longue distance

Les semences contaminées sont une voie de transmission fréquente des bactéries phytopathogènes (Blakeman, 1991) et sont également la principale source de contamination des Brassicacées par *X. campestris* (Cook *et al.*, 1952; Schaad *et al.*, 1980; Schultz and Gabrielson, 1986). La plupart des semences sont contaminées suite à l'infection des siliques en cas de forte humidité ou lorsqu'elles sont lessivées par temps de pluie, et par l'intermédiaire des funicules via les tissus vasculaires (Walker 1952). La présence de trois à cinq graines infectées sur 10 000 suffit pour causer une incidence élevée de la maladie au champ (Schaad *et al.*, 1980).

Toutefois, les semences ne constituent pas la seule source de contamination pour ces bactérioses. Les Brassicacées adventices ainsi que les débris végétaux contaminés des récoltes précédentes sont également de sérieuses sources de contamination (Williams, 1980).

La conservation dans le sol

Le pathogène est capable de survivre pendant l'hiver dans les débris végétaux contaminés des récoltes précédentes (Schaad and Kendrick, 1975;

2.6 Les caractéristiques cellulaires des *Xanthomonas*

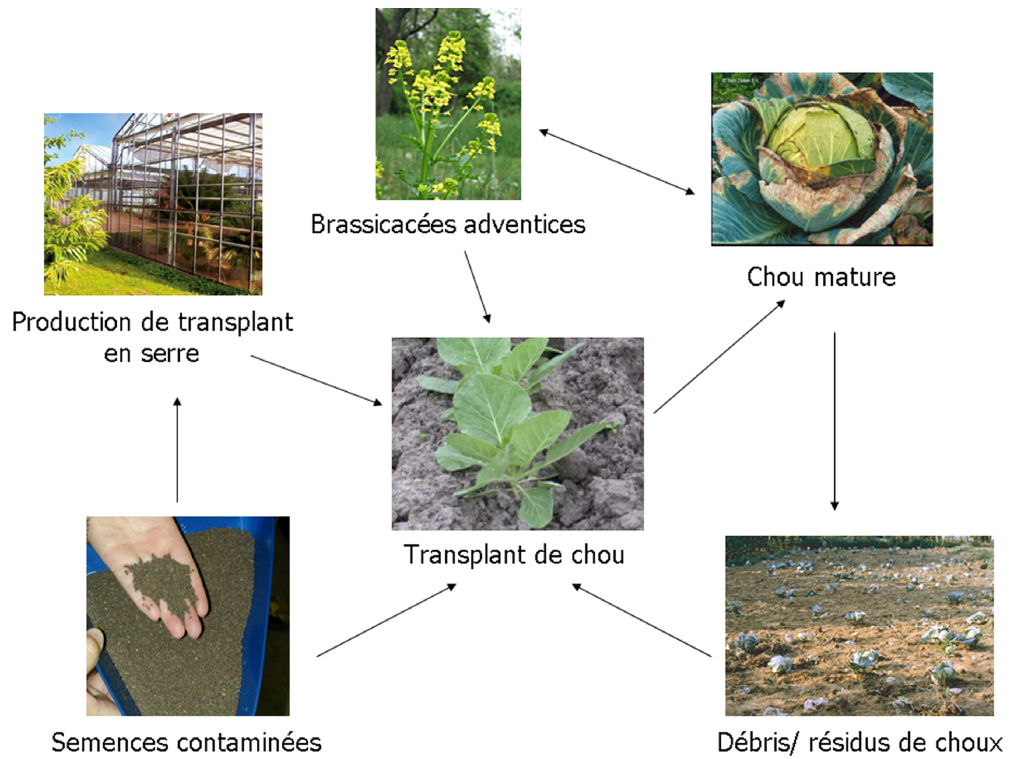


FIG. 2.19 – Le cycle infectieux de *X. campestris*.

Alvarez and Cho 1978 ; Dzhali-
lov and Tiwari, 1995). Sa durée de survie et sa
propagation éventuelle sont influencées par l'état d'avancement de la décom-
position des débris végétaux. Alors que les résidus de choux frais permettent
aux pathogènes d'infecter rapidement les choux voisins, des débris en décom-
position avancée limitent fortement la dispersion du pathogène (Kocks and
Zadoks, 1996). Le pathogène peut survivre pendant deux ans environ dans
le sol tant que les résidus de culture ne sont pas décomposés, constituant
alors une nouvelle source d'infection (Schultz and Gabrielson, 1986 ; Dzhali-
lov and Tiwari, 1995 ; Kocks and Zadoks, 1996 ; Schaad and White, 1974).
Le pathogène peut également survivre librement dans le sol pendant 40 à 60
jours (Schaad and White, 1974).

Les Brassicacées adventices

Un grand nombre de Brassicacées adventices servent de plantes hôtes
alternatives aux *X. campestris*, permettant leur multiplication et leur conser-
vation toute l'année ; elles constituent une source d'inoculum non négligeable
notamment en bordure des parcelles (Young, 1969). Les mauvaises herbes de
la famille des Brassicacées sont communes dans les champs de production de
choux et sont des réservoirs d'inoculum important. Les travaux de Schaad
and Dianese (1981) montrent notamment que *X. c. pv. campestris* peut être
disséminé dans un rayon de 12 m autour d'une mauvaise herbe infectée. Les
Brassicacées adventices contaminées ne développent pas systématiquement
des symptômes et restent bien souvent asymptomatiques (Schaad et Dianese,
1981).

La dispersion des *X. campestris* à courtes distances

L'eau est le principal agent dispersant de l'agent pathogène. En pépinière,
X. campestris se disperse rapidement de plante à plante sous l'action de la
rampe d'irrigation (Grimm and Vogelsanger, 1990). En plein champ, ce sont
les gouttes de pluie en combinaison avec le vent qui assurent sa propagation

(Williams, 1980). En tombant, les gouttes de pluie lessivent la surface des feuilles contaminées, puis rebondissent en cascade sur les feuilles voisines. Le vent favorise ces contacts (Kuan *et al.*, 1986 ; Williams, 1980). Sur la plante, la bactérie se propage principalement par le ruissellement des gouttelettes d'eau contaminées. Les insectes peuvent également constituer un vecteur de transmission de la maladie bien que celui-ci reste mineur (van der Wolf *et al.*, 2006).

Les voies d'entrées des bactéries

La bactérie pénètre dans le limbe de la feuille par les voies d'entrées naturelles comme les hydathodes et les stomates (figure 2.20) (Shigaki *et al.*, 2000) mais aussi par des blessures provoquées par les intempéries ou les insectes. Les hydathodes sont des structures semblables aux stomates situés à l'extrémité des nervures en marge des feuilles. Elles assurent le phénomène de la guttation qui se produit dans des conditions d'humidité élevée i.e. une pression racinaire combinée à un faible niveau d'évapotranspiration (Ruissen and Gielink, 1992). Lorsque la plante gutte, de multiples gouttelettes suintent en marge des feuilles. Les bactéries présentes à la surface des feuilles sont incorporées dans ces gouttes ; lorsque la transpiration s'accélère et que les stomates s'ouvrent, les gouttes sont réabsorbées, ce qui permet au pathogène de pénétrer dans la feuille (Williams, 1980). Alors que les hydathodes constituent la voie d'entrée par excellence de *X. c. pv. campestris* et de *X. c. pv. incanae* (Williams, 1980 ; Kendrick and Baker, 1942), *X. c. pv. armoraciae* pénètre dans la plante préférentiellement par les stomates, provoquant les symptômes caractéristiques de taches sur feuilles (Hugouvieux *et al.*, 1998).

Les conditions favorables à la maladie

X. campestris est une bactérie épiphyte, c'est-à-dire qu'elle est capable de coloniser les parties aériennes des plantes sans toutefois causer de symptômes (Kuan *et al.*, 1986). Lorsque les conditions environnementales deviennent pro-



FIG. 2.20 – Les voies d’entrées des bactéries : A) par les stomates ; B) par les hydathodes ; C) par les blessures.

pices à l’infection, la bactérie pénètre dans la plante par les voies d’entrées naturelles ou les blessures, puis colonise l’intérieur des tissus en provoquant l’apparition des symptômes caractéristiques de la maladie (Hayward, 1974). Une température se situant entre 25°C et 28°C, un niveau d’humidité élevé et des conditions pluvieuses favorisent le développement des symptômes. Au contraire par temps sec, les lésions s’assèchent et la progression des symptômes est arrêtée (Schaad and Alvarez, 1993). Ils peuvent également apparaître à une température comprise entre 16°C et 18°C. Néanmoins le développement de la maladie se fera plus lentement (Hunter *et al.*, 1975).

2.7 Les moyens de lutte contre les *X. campestris*

2.7.1 Les mesures prophylactiques

Les moyens de lutte contre les bactérioses des Brassicacées, en particulier de la nervation noire, se basent principalement sur un ensemble de mesures prophylactiques visant à minimiser les risques de contamination de la culture. Ces pratiques sanitaires incluent : i) la suppression Brassicacées adventices, ii) l’élimination de tous les débris qui ont pu être contaminés, iii) une rotation

des cultures sur trois ans en alternance avec des cultures non apparentées aux Brassicacées, iv) l'élimination des plants infectés en serre, et enfin, v), l'utilisation de graines désinfectées ou ayant subi un contrôle sanitaire (Williams, 1980).

2.7.2 L'utilisation de produits chimiques

Des produits chimiques à base de cuivre ou de zinc sont généralement utilisés pour lutter contre les maladies d'origine bactérienne (Messiaen *et al.*, 1991). Leur efficacité est bien souvent imparfaite, n'ayant qu'une action bactériostatique : ils ralentissent le développement de la maladie mais ne l'éradiquent pas (Messiaen *et al.*, 1991). Dans certain cas, ces applications se révèlent également phytotoxiques pour certaines plantes (Xiong *et al.*, 2006). Depuis une vingtaine d'années une résistance au cuivre a été observée chez certains *Xanthomonas*. Cette résistance, portée par un plasmide, peut facilement se transmettre des souches résistantes aux souches sensibles (Stall *et al.*, 1986), rendant ces traitements chimiques de plus en plus inefficaces. D'autres traitements à base de sels de mercure ou antibiotiques ont été étudiés, mais n'ont pas été autorisés en culture (Schaad and Dianese, 1981). Ainsi, en l'absence de bactéricides efficaces et applicables à grande échelle contre les bactéries, la lutte s'est orientée vers le contrôle sanitaire des semences pour les bactérioses transmises par semences.

Plusieurs traitements de semences sont disponibles : eau chaude, peroxyde d'hydrogène, acétate de cuivre et sulfate de zinc, *etc.* (Walker 1952 ; Humaydan *et al.*, 1980 ; Schaad *et al.*, 1980 ; Huang and Lee, 1988). Néanmoins, de la même manière que pour les traitements en plein champ, aucun n'est réellement efficace : soit le pathogène n'est pas entièrement éradiqué, soit la germination (Williams 1980) et la vigueur des cultivars sont terriblement affectées (Williams 1980 ; Patel *et al.*, 1949).

2.7.3 La culture de variétés résistantes ou tolérantes

L'utilisation de cultivars résistants peut réduire significativement les pertes dues aux maladies. Lorsque de telles variétés résistantes ou tolérantes existent, elles représentent la solution la plus simple et la moins coûteuse pour le producteur. La principale difficulté pour sélectionner des cultivars résistants est d'identifier les gènes conférant cette résistance, et de les introduire dans les variétés cultivées tout en conservant leurs caractéristiques agronomiques.

L'identification du premier cultivar de *B. rapa* résistant à *X. campestris* est assez récente (Bain, 1952). Actuellement, les sources de résistance à *X. campestris* sont présentes dans les génomes A et B (*B. rapa* et *B. nigra*) mais sont absentes dans les cultivars du génome C (*B. oleracea*) (Bain, 1952 ; Guo *et al.*, 1991). Les premiers travaux de sélection variétale, pour la résistance à la nervation noire, n'ont pas été efficaces car ils ont été entrepris sans que soit connue l'existence des variants pathogéniques (race) chez *X. c. pv. campestris* (Ignatov *et al.*, 1998 ; Vicente *et al.*, 2002). Par la suite, le nombre de races chez le pathogène a été un facteur limitant l'efficacité de la sélection (Kamoun *et al.* 1992 ; Vicente *et al.*, 2001), Les études actuelles portent sur l'identification de gènes de résistance correspondant aux six races du pathogène (Soengas *et al.*, 2007).

2.7.4 La Lutte biologique contre *X. campestris*

La lutte biologique est l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dommages causés par les ravageurs et les pathogènes sur les cultures. Pour lutter contre les bactérioses induites par *X. campestris*, des bactéries antagonistes, des souches appartenant au genre *Bacillus*, sont utilisées. Ces antagonistes sont des bactéries endophytes : bactéries omniprésentes chez la plupart des espèces végétales et colonisant l'intérieur des tissus végétaux sans effet préjudiciable pour la plante (Hollis, 1951 ; Samish *et al.*, 1963). Wulff *et al.*, (2002) et Massomo *et al.* (2004) ont montré que des souches

appartenant au genre *Bacillus* ont un bon potentiel antagoniste contre la nervation noire (Wulff *et al.*, 2002; Massomo *et al.*, 2004). Néanmoins, en condition très favorable à la maladie, leurs actions restent limitées (Wulff *et al.*, 2002; Massomo *et al.*, 2004). Malgré les progrès de ces dernières années, le nombre de cas concrets d'application de lutte biologique en phytopathologie reste marginal et cette démarche doit encore démontrer son caractère opérationnel.

2.7.5 Le contrôle sanitaire des semences

Le contrôle sanitaire des semences repose sur la mise en œuvre de différentes procédures visant à garantir l'absence d'un pathogène dans un lot de semences à un seuil donné. Pour les *Brassica* spp. le taux de contamination ne doit pas excéder une graine sur 30 000 dans les lots de semences commercialisées (Franken *et al.*, 1991). La qualité sanitaire des semences est un critère très important pour leur commercialisation et pour la gestion de la qualité sanitaire des cultures. Il est un des moyens majeurs de la mise en place de la politique de développement dans le cadre d'une agriculture durable et respectueuse de l'environnement. Les méthodes de détection conventionnelles proposées par l'ISTA (*International Seed Testing Association*) et en France par le LNPV (Laboratoire National de Protection des Végétaux) reposent sur des techniques microbiologiques, c'est-à-dire basées sur l'isolement de la bactérie sur milieu nutritif sélectif. Elles sont réalisées par des laboratoires spécialisés comme la SNES (Station Nationale d'Essais de Semences) ou les laboratoires « Qualité » des établissements semenciers. Le milieu sélectif ne permet pas à lui seul d'identifier le pathogène, et l'isolement des bactéries suspectes est suivi de tests de pouvoir pathogène sur plantes sensibles pour valider le diagnostic (Roberts and Koenraadt, 2006).

Pour *X. c. pv. campestris* la méthode de détection officielle « 7-019 : *Detection of Xanthomonas campestris pv. campestris on Brassica spp* » a été

adoptée par L'ISTA et est disponible sur leur site web¹ (Roberts and Koenaadt, 2006). Cette méthode officielle est considérée comme fiable et efficace pour la détection en routine (Schaad, 1989), bien qu'elle reste coûteuse et contraignante (Chitarra *et al.*, 2002; Tsygankova *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005, 2006). Alors qu'il existe de nombreux couples d'amorces spécifiques détectant les *X. campestris*, (Tsygankova *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005, 2006) l'utilisation de techniques moléculaires de détection n'a pas encore été adoptée par l'ISTA. Des améliorations de la méthode de détection sont encore nécessaires en termes de rapidité et de spécificité. De plus, suite à la mise en place de techniques de désinfection des semences, il devient nécessaire que les méthodes de détection utilisées soient capables de certifier l'absence de germes vivants dans l'échantillon.

¹<http://www.seedtest.org/en/content—1-1132-241.html>

Objectifs du travail

Le but de ce travail était en premier lieu de clarifier la pathogénie et la génétique des populations de cette espèce en précisant sa phylogénie et en mesurant l'implication de la mutation et de la recombinaison dans l'évolution des populations pathogènes. Ensuite il s'agissait de proposer un nouvel outil de détection fiable et rapide des bactéries vivantes appartenant aux pathovars de *X. campestris*.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux différentes maladies qui pouvaient être induites par les *X. campestris*. Il nous fallait déterminer s'il existait effectivement six maladies engendrées par six pathovars distincts, ou bien si des synonymies dans le pouvoir pathogène et dans la gamme d'hôtes étaient présentes chez cette espèce. Si ce dernier cas se vérifiait, nous nous proposons de modifier la nomenclature des *X. campestris* en conséquence.

Il nous fallait étudier par ailleurs la diversité génétique de l'espèce afin de proposer des signatures génétiques de chacun des pathovars pouvant être utilisées pour la détection du pathogène dans les semences. Nous nous sommes donc attachés à typer génétiquement les différents pathovars de notre collection. Nous avons choisi d'utiliser une approche de type MLSA-MLST afin de clarifier la phylogénie et la structure génétique de l'espèce. Notre objectif était toutefois multiple ; outre l'intérêt d'obtenir des séquences spécifiques, nous voulions comprendre la structure génétique du groupe et déterminer si la classification basée sur le pouvoir pathogène pouvait être superposée à la classification phylogénétique moléculaire que nous allions obtenir. Motivés par l'existence de transfert de gènes entre les *Xanthomonas*, nous voulions également connaître quelles sont les différentes sources de polymorphisme créatrices de diversité dans cette espèce (recombinaison ou mutation).

L'objectif finalisé de ces travaux est de mettre au point un outil de détection qui allie sensibilité, spécificité et rapidité. Devant les exigences de la

législation internationale vis-à-vis du contrôle sanitaire des semences qui va imposer de renseigner sur la viabilité des bactéries dans les lots de semences, nous nous sommes fixé comme objectif de fournir une méthode qui réponde également à cette condition.

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 3

Étude de la diversité pathologique des *X. campestris*

Contexte scientifique

Six pathovars ont été décrétés capables de provoquer une maladie sur Brassicacées (Bradbury, 1986). Ce sont les seuls représentants de l'espèce *X. campestris* (Vauterin *et al.*, 1995), suivant la définition de l'espèce bactérienne (Stackebrandt *et al.*, 2002), c'est à dire partageant des valeurs d'hybridations ADN-ADN supérieures à 70%. Les profils génétiques obtenus par rep-PCR (Rademaker *et al.*, 2005) confirment l'existence des vingt espèces génomiques du genre *Xanthomonas* décrites par Vauterin *et al.* (1995) et attestent également que l'espèce *X. campestris* se restreint bien à ces six pathovars.

L'un des problèmes majeurs de la nomenclature des bactéries phytopathogènes est que leurs noms leur ont le plus souvent été attribués suivant l'hôte d'isolement d'origine, plutôt que selon le type de symptôme qu'elles induisent sur une gamme de plantes hôte. Ce concept, nouvel hôte nouvelle espèce, est à l'origine de nombreuses synonymies (Starr, 1981). Alors que certaines synonymies ont, depuis, été corrigées (Van Den Mooter and Swings 1990 ; Young, 2005), aucune correction n'avait été apportée pour l'espèce *X. campestris*.

C'est Alvarez *et al.* (1994) qui, par une étude sérologique, soulèvent pour la première fois le problème de synonymie entre les pathovars *raphani* et *armoraciae*; néanmoins, aucune nouvelle nomenclature n'est proposée. Ainsi, ces deux pathovars ont conservé leur souche type et ont été utilisés comme deux pathovars indépendants au sein de cette espèce (Vauterin *et al.* 1995, Rademaker *et al.*, 2005). L'une des conditions indispensables pour proposer une nouvelle nomenclature aurait été d'utiliser pour chaque pathovar étudié, la souche type - constituant la référence sur laquelle se base l'identification - et de démontrer que les souches types ainsi qu'un échantillon représentatif de chacun des pathovars étaient identiques. Or Alvarez *et al.* (1994) n'ont utilisé que la souche type du pathovar *campestris* (CFBP 5241) et aucune souche appartenant aux pathovars dont on suspectait la similitude.

Dans son *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*, Bradbury (1986), précise que le pathovar *aberrans* serait possiblement synonyme de *X. c. pv. campestris*. Cependant, les travaux d'Alvarez *et al.* (1994), basés sur des tests sérologiques, montrent que le pathovar *aberrans* a un profil de réaction différent des pathovars *campestris* et *armoraciae* et qu'il devrait conserver son statut de pathovar indépendant. Cette contradiction sur la pertinence du pathovar *aberrans* n'a été soutenue ni par Vauterin *et al.* (1995), ni par Vicente *et al.* (2001).

Vauterin *et al.* (1995) auraient observé, lors de travaux préliminaires (non publiés) à la reclassification des *Xanthomonas*, que les pathovars *raphani* et *aberrans* ne semblaient pas différents du pathovar *campestris* car ils induisaient des symptômes similaires sur choux et radis. La synonymie entre les pathovars *aberrans* et *campestris* a été soutenue par Vicente *et al.* (2001). Ils montrent également que la souche type du pathovar *raphani* (CFBP 5827) provoque la nervation noire et n'est donc pas différente du pathovar *campestris*.

Au cours de l'année 2006, Vicente *et al.* ont publié une étude sur les maladies des taches foliaires causées par les pathovars *raphani* et *armoraciae*,

confirmant la synonymie des deux pathovars et révélant trois races au sein de *X. c. pv. raphani*. Ils précisent qu'ils ne sont pas néanmoins capables de confirmer l'existence du pathovar *armoraciae* tel que l'avait décrit McCulloch (1929).

Lorsque cette thèse a débuté, à la vue des différents travaux relatifs à cette espèce, il était évident que la subdivision de l'espèce *X. campestris* en six pathovars était floue, et que ces six pathovars ne correspondaient pas tous à un pathovar au sens où Young *et al.*, (1978) le définissent. Ainsi, notre premier objectif a été de clarifier la taxonomie de l'espèce *X. campestris* par une étude du pouvoir pathogène des souches sur des gammes d'hôtes différentielles.

Nous avons à notre disposition, en collection à la CFBP, les six souches types des différents pathovars; parmi elles, les deux souches de *X. c. pv. campestris* séquencées, la souche *X. c. pv. armoraciae* 756 C dont le génome est en cours de séquençage, ainsi qu'au moins deux représentants de chaque pathovar. Pour définir la gamme d'hôtes des différents pathovars, nous nous sommes assurés d'obtenir une gamme de cultivars appartenant aux genres *Brassica*, *Raphanus*, *Matthiola*, *Cheiranthus*, *Iberis* et *Barbarea*, mais également des plantes appartenant à la famille des Solanaceae.

Afin de réaliser une étude complète sur le type d'interaction entre *X. campestris* et les Brassicacées nous nous sommes attachés à définir la race de chacune des souches étudiées en utilisant la gamme de cultivars hôtes décrite par Vicente *et al.* (2001, 2006). Pour cela nous avons obtenu les souches types des races de *X. c. pv. campestris* ainsi que les différents cultivars nous permettant d'établir cette subdivision.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article intitulé « *Pathogenicity assays restrict the *Xanthomonas campestris* species (Vauterin *et al.*, 1995) into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris** » accepté pour publication dans la revue internationale *Plant Pathology*, et dont les principaux résultats et conclusions sont les suivants :

Au terme de notre étude sur le pouvoir pathogène des différentes souches de notre collection et en accord avec la définition des pathovars de Young *et al.*, (1978) et de Dye *et al.*, (1980) nous pouvons conclure qu'il existe bien, au sein de l'espèce *X. campestris*, uniquement trois pathovars capables de provoquer une maladie :

- i) La nervation noire est provoquée par *X. c. pv. campestris* sur des plantes de la famille des Brassicaceae. Nous proposons que toutes les souches provoquant la nervation noire sur au moins une Brassicacée soient regroupées dans le pathovar *X. c. pv. campestris*.
- ii) La maladie des taches foliaires est occasionnée par *X. c. pv. raphani* sur des plantes de la famille des Brassicaceae et quelques plantes de la famille des Solanaceae. Nous incluons dans ce pathovar la souche séquencée 756C identifiée comme *X. c. pv. armoraciae* et ne soutenons pas l'existence d'une autre maladie des taches foliaires causée par *X. c. pv. armoraciae*.
- iii) La maladie du dépérissement des giroflées est provoquée par *X. c. pv. incanae*.

Nous avons également mis en évidence qu'il existe des souches de *X. campestris* disponibles dans les collections internationales de micro-organismes de *X. campestris* pour lesquelles nous n'avons pu déterminer d'hôte sensible. Nous proposons que ces souches qui n'induisent aucun symptôme sur Brassicacées dont leur plante hôte d'origine, perdent leur nomenclature en pathovar et soient nommées *X. campestris* seulement.

Nous avons démontré l'existence de trois races supplémentaires aux six races précédemment décrites au sein de *X. c. pv. campestris*. Les souches séquencées ATCC 33913 (CFBP 5241) et Xcc 8004 (CFBP 6650) appartiennent respectivement à la race 3 et à la race 9, une des nouvelles races décrites.

Pathogenicity assays restrict the *Xanthomonas campestris* species (Vauterin *et al.*, 1995) into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*

E. Fargier^{1,2} and C. Manceau¹

Abstract

The *Xanthomonas campestris* (Vauterin) species groups bacteria associated with cruciferous plants. In order to clarify and refine the pathovar and the race structures within *X. campestris*, forty seven representative strains of six pathovars were characterized for their pathogenicity on a large host range of Cruciferae including all original hosts. Three diseases were observed on tested plants. (i) The black rot disease on cruciferous plants; hence, we propose to group all strains that cause black rot on at least one cruciferous plant in the single pathovar *X. c.* pv. *campestris*. (ii) The leaf spots disease is caused by *X. c.* pv. *raphani* on hosts belonging to Cruciferae and Solanaceae. We include in this pathovar, the sequenced 756C strain identified as *X. c.* pv. *armoraciae*, and we do not support the existence of another leaf spot disease caused by *X. c.* pv. *armoraciae*. (iii) The bacterial blight of garden Stocks is caused by *X. c.* pv. *incanae*. We did not find plants susceptible to *X. c.* pv. *barbareae*. Strains that do not induce any symptom on cruciferous plants tested, including their original hosts, were removed of the pathovar scheme and were named *X. campestris* only. Moreover, we described three new races in addition to the six races previously described within *X. c.* pv. *campestris*. The sequenced strains ATCC 33913 (CFBP 5241) and Xcc 8004 (CFBP 6650) belongs to race 3 and to race 9, one of the new races described, respectively.

Keywords: Crucifers, PCR specific primers, tomato, pepper, virulence

¹INRA ANGERS, UMR Pathologie Végétale, 42 rue Georges Morel, B.P. 60057, 49071 Beaucouzé Cedex, France

²GEVES la Minière, 78285 Guyancourt, France

3.1 Introduction

Since 1995, the *Xanthomonas* genus has been reclassified into twenty one species according to DNA/DNA homology (Vauterin *et al.*, 1995; Trebaol *et al.*, 2000). Various techniques have been used to assess the diversity of the *Xanthomonas* genus at the species and pathovar levels, such as fatty acid profiles (Vauterin *et al.*, 1996), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Rademaker *et al.*, 2000) and repetitive DNA-polymerase chain reaction (PCR)-based genomic fingerprinting (rep-PCR) (Rademaker *et al.*, 2000, 2005). Thus, the *Xanthomonas campestris* species, defined by DNA/DNA homology groups (Vauterin *et al.*, 1995), was restricted to six pathovars that have been reported to cause diseases on various cruciferous plants: *X. c.* pv. *aberrans* (Knösel, 1961) Dye 1980, *X. c.* pv. *armoraciae* (McCulloch, 1929) Dye 1980, *X. c.* pv. *barbareae* (Burkholder, 1941) Dye 1980, *X. c.* pv. *campestris* (Pammel, 1895) Dowson 1939, *X. c.* pv. *incanae* (Kendrick and Baker, 1942) Dye 1980 and *X. c.* pv. *raphani* (White, 1930) Dye 1980. Pathovars and races were defined within *X. campestris* based on the differential responses induced by the pathogen on various cultivars of cruciferous plants. Although pathovars are defined according to the type of symptoms that they induce to the host plant from which they were isolated and according to their host range (Bradbury, 1984) (Dye, 1980), strains of *X. campestris* were often assigned to a pathovar only on the basis of the host plant from which they were first isolated in practice (Starr, 1981). Thus, most of *X. campestris* pathovars have a larger host range than that specified by their name (Starr, 1981). Based on this fact, Alvarez *et al.* (1994), Vauterin *et al.* (1995) and Vicente *et al.* (2001, 2006) have expressed some doubts about the denomination and the existence of some of these pathovars.

The subdivision into races of the *X. campestris* species has been obtained on the basis on differential responses induced by the pathogen on various cultivars of cruciferous plants. Thus, six races were defined within *X. c.* pv. *campestris* (Kamoun *et al.*, 1992; Vicente *et al.*, 2001), and three races

3.1 Introduction

were recently described within *X. c. pv. raphani* (Vicente *et al.*, 2006). *X. campestris* is a model for numerous basic studies in the field of molecular plant-microbe interaction, since this bacterium is also pathogenic on the extended used plant model *Arabidopsis thaliana* (Daniels *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 2005). Moreover, *X. campestris* represents a unique bacterial model for genomic studies since the complete genome was sequenced and annotated for two strains of *X. c. pv. campestris* e.g. ATCC 33913 (CFBP 5241) (da Silva *et al.*, 2002) and Xcc 8004 (CFBP 6650) (Qian *et al.*, 2005). Another strain, identified as *X. c. pv. armoraciae* 756C, (Kamdar *et al.*, 1993) is also under sequencing (<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=Xca>).

Our main objective was to precise the identity of strains of *X. campestris* available in international collections at the pathovar and race level which is very important since it will orientate future comparative genome studies. We assessed the pathogenicity of a collection of representative strains for all *X. campestris* pathovars, including the strains whose genome was completely sequenced. Pathogenicity assays were done on a common range of cultivars of cruciferous plants differential for pathovar identification and race determination. Results presented in this study allow us to correct the identity of certain strains of *X. campestris*, and to clarify the pathovar structure of this species in respect with the pathovar definition (Dye *et al.*, 1980). It has also led us to define three additional pathogenic variants (races) within *X. c. pv. campestris*.

New nomenclature of <i>X. campestris</i> sp.	Strain number ^a	Other collections	Host	Isolation ^b			PCR ^d	
				Year	Country	Race ^c	Zup primers	Other primers
Received as <i>X. c. pv. aberrans</i>								
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 6865 ^{pt}	NCPBP 2986	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1975	Australia	5	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 6863	NCPBP 875	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1958	Germany	8	+	+
Received as <i>X. c. pv. armoraciae</i>								
<i>X. campestris</i>	CFBP 5824	LMG 7383, NCPBP 1930	<i>Armoracia rusticana</i>	1939	USA	NP	-	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 3838 ^{pt}	LMG 535, NCPBP 347	<i>Iberis</i> sp.	1954	Tanzania	NP	+	+
<i>X. c. pv. raphani</i>	756C ^e	Kamdar et al., 1993	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (seed)		E. Asia	3R	-	+
Received as <i>X. c. pv. barbareae</i>								
<i>X. campestris</i>	CFBP 5825 ^{pt}	LMG 547, NCPBP 983	<i>Barbarea vulgaris</i>	1939	USA	NP	-	+
<i>X. campestris</i>	CFBP 5826	LMG 7385	<i>Barbarea vulgaris</i>	1939	USA	NP	-	+
Received as <i>X. c. pv. campestris</i>								
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 1119		<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1967	France	1	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 1121		<i>B. oleracea</i> cv. <i>bullata gemmifera</i>	1967	France	1	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 1869		<i>B. oleracea</i>	1976	Ivory Coast	1	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 4952		<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>cortes</i>	1999	Belgium	1	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5127	SNES 3316	<i>B. oleracea</i>	2000		1	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5128	SNES 3330	<i>B. oleracea</i>	2000		1	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5129	SNES 3429	<i>B. oleracea</i>	2000		1	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5815	Clause 628a1cs	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Spain	1	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5816	Clause 656C1FS1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Spain	1	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5818	Clause 751a2FS	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2001	Spain	1	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	HRI 3811 ^f		<i>B. oleracea</i>		USA	1	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	305 ^g		<i>B. oleracea</i>		Netherlands	2	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5241 ^T	LMG 568, ATCC 33913	<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	1957	UK	3	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5683		<i>B. oleracea</i>	1979	France	3	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	277 ^s		<i>B. oleracea</i>		Netherlands	4	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 4956		<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>spacestar</i>	1999	Belgium	4	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5817	Clause 658pCS1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2001	Chili	4	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	Xcc 147 ^e		<i>B. oleracea</i>			4	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 1712		<i>B. oleracea</i> cv. <i>capitata</i>	1975	France	5	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 1713		<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1975	France	5	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 4954		<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>aviso</i>	1999	Belgium	6	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 6943		<i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>	2005	China	6	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	HRI 6181 ^f		<i>B. rapa</i>	1996	Portugal	6	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 4953 ^h		<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>cortes</i>	1999	Belgium	7	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5130	SNES 3430	<i>B. oleracea</i>	2000		7	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 1124 ^h		<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1967	France	8	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 1710		<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1975	France	8	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 1711		<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1975	France	8	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5820	Clause 2963	<i>B. oleracea</i>			8	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 4955		<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>aviso</i>	1999	Belgium	9	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 5814	Clause 563apcs	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Spain	9	+	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	CFBP 6650 ^h	LMG 8004, NCPBP 1145	<i>B. oleracea</i>	1958	UK	9	+	+

New nomenclature of <i>X. campestris</i> sp.	Strain number ^a	Other collections	Host	Isolation ^b			PCR ^d	
				Year	Country	Race ^c	Zup primers	Other primers
Received as <i>X. c. pv. incanae</i>								
<i>X. c. pv. incanae</i>	CFBP 1371		Matthiola incana	1972	France	NP	+	+
<i>X. c. pv. incanae</i>	CFBP 1438	NCPPB 1934	<i>Matthiola incana</i>	1949	USA	NP	+	+
<i>X. c. pv. incanae</i>	CFBP 1606		Ornamental cruciferous plants	1974	France	NP	-	+
<i>X. c. pv. incanae</i>	CFBP 2527 ^{pt}	LMG 7490, NCPPB 937	<i>Matthiola incana</i>	1950	USA	NP	+	+
<i>X. c. pv. incanae</i>	CFBP 5686	Shmit J. 10903	<i>Matthiola incana</i>	1981	France	NP	+	+
Received as <i>X. c. pv. raphani</i>								
<i>X. c. pv. raphani</i>	CFBP 5827 ^{pt}	LMG 860, NCPPB 1946	<i>Raphanus sativus</i>	1940	USA	3R	-	+
<i>X. c. pv. raphani</i>	CFBP 5828	LMG 7505	<i>Raphanus sativus</i>		USA	3R	-	+
<i>X. c. pv. raphani</i>	CFBP 5829	LMG 8134	<i>Raphanus sativus</i>		USA	3R	-	+

^a pt, pathotype strain; T, type strain.

^b Year of isolation and country of origin given where known.

^c NP, non pathogenic on differential cultivars; 3R for race 3 of *X. c. pv. raphani*.

^d +, positive; -, negative PCR amplification with ZUP primers (Rijlaarsdam *et al.*, 2004) and other primers (Tsygankova *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005)

^e LIPM, Toulouse, France.

^f Vicente *et al.* (2001).

^g Clause-Tezier laboratory Angers France.

^h additional race type strains proposed for *X. c. pv. campestris*.

Table 3.1: Host range of *X. campestris* pathovars from cruciferous hosts

3.2 Materials and methods

3.2.1 Bacterial strains

The strains of *X. campestris* used in this study were obtained from the Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), from Clause-Tézier laboratory, Angers, France and from Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), Toulouse, France (Table 3.1). Forty eight strains of *Xanthomonas* belonging to eighteen other species were also used (data not shown). All strains were routinely cultured on YPGA (yeast extract 7 g/L, peptone 7 g/L, glucose 7 g/L and agar 15 g/L) or YPA (yeast extract 7 g/L, peptone 7 g/L and agar 15 g/L) at 27°C. Cultures were stored in water at -20°C for short term conservation and freeze-dried for long term conservation.

3.2.2 DNA preparation and PCR amplification

Bacterial strains were cultured in YPA at 27°C for 24h, and bacterial suspensions (10^7 cfu/mL) were made in sterile distilled water. DNA extractions were performed according to the method described by Llop *et al.* (1999). The Five primer sets defined by Rijlaarsdam *et al.* (2004), Tsygankova *et al.* (2004), Park *et al.* (2004) and Berg *et al.* (2005) were used to identify *X. campestris*. All amplifications were carried out in a final volume of 20 μ l containing 1 X Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega), 200 μ M of each dNTP (Promega), 400 nM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 1 unit of GoTaq[®] Flexi DNA polymerase (Promega) and 50 ng of genomic DNA. Reactions were performed according to the author's instructions (Tsygankova *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005). We optimised the amplification programs for the primers defined by Rijlaarsdam *et al.* (2004). The reactions were run for 35 cycles, each consisting of 30 s at 94°C, 30 s at 62°C, and 30 s at 72°C, with initial denaturation step of 5 min at 94°C and final extension

of 5 min at 72°C. Amplification products were separated on a 1.5 % agarose gel in TBE, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light on a GelDoc 2000 (Bio-Rad).

3.2.3 Plant material and plant inoculations

The plant species and cultivars used in this study for the determination of pathogenicity are listed in Table 3.2 and those used for race typing are listed in Table 3.3. These plants included hosts of the different pathovars described in *X. campestris* species: *Brassica* sp., *Raphanus* sp., *Barbarea* sp., *Iberis* sp., *Cheiranthus* sp., *Matthiola* sp., *A Armoracia* sp., *Capsicum annuum* and *Lycopersicon esculentum*. The cultivars and accessions of *Brassica* sp. used for race typing were those used by Vicente *et al.* (2001, 2006). Plants were raised from seed sown in 10 cm² plastic pots filled with a fertilized substrate (Huminsubstrat N3, Neuhaus, NL). Pots were placed in a greenhouse at 20°C/15°C (day/night) and with supplemented lighting from October to March to have at least 16 h/8 h (day/night).

Plants were inoculated four or five weeks after sowing, depending on the number of leaves by plant. For *Iberis* sp., *Matthiola* sp. and *Cheiranthus cheiri* which have very small leaves, inoculations were performed when the plants had about ten leaves. For the other plants, inoculations were performed when they had four leaves at least. Two inoculation methods were performed: either by spraying a bacterial suspension onto the leaf surfaces or by cutting the edge of the limb of the leaves and applying bacteria on wounds. Inoculation by cutting the limb of the leaves was used to facilitate the bacterial invasion of the plant vessels and inoculation by spraying was performed to reproduce natural infection through hydrotodes and stomata.

Bacterial inocula were prepared with bacterial cultures grown on YPGA at 27°C for 24 h. For spray inoculation, bacterial cells were suspended in sterile distilled water and adjusted to 1×10^8 cfu/mL approximately. Then, the bacterial suspensions were sprayed on plants with a hand atomizer until

Chapitre 3. Étude de la diversité pathologique des *X. campestris*

Species	Varieties	Type	Cultivars	Sources
<i>Brassica oleracea</i>	var. <i>italica</i>	Brocoli	Vert à jets	La Semeuse (France)
<i>Brassica oleracea</i>	var. <i>gemmifera</i>	Brussel sprouts	Véraline	La Semeuse (France)
<i>Brassica oleracea</i>	var. <i>capitata</i>	Cabbage	Tête de pierre très précoce F1	La Semeuse (France)
<i>Brassica oleracea</i>	var. <i>botrytis</i>	Cauliflower	Géant d'automne primus	La Semeuse (France)
<i>Brassica oleracea</i>	var. <i>acephala</i>	Collards	Protéor	La Semeuse (France)
<i>Brassica oleracea</i>	var. <i>capitata</i>	White cabbage	Bartolo	Vilmorin (France)
<i>Brassica oleracea Gongylodes</i>		Kohlrabi	Hâtif de Vienne	La Semeuse (France)
<i>Brassica napus</i>	var. <i>napobrassica</i>	Turnip rutabaga	Jaune champion à collet violet	La Semeuse (France)
<i>Brassica rapa</i>		Turnip	Demi long blanc dur d'hiver	La Semeuse (France)
<i>Brassica juncea</i>	var. <i>rugosa</i>	Japanese mustard	Red Giant	graines voltz (France)
<i>Raphanus sativus</i>		Radish	Blanche transparente Race Glaçon	La Semeuse (France)
<i>Raphanus sativus</i>		Radish	Rond Gaudry 2	La Semeuse (France)
<i>Raphanus sativus</i>	var. <i>niger</i>	Black radish		Vilmorin (France)
<i>Barbarea vulgaris</i>		Yellow rocket		Botanisher garden der Universität Zürich (Switzerland)
<i>Iberis sempervirens</i>		Candytuft	Thlaspi vivace	Royalffleur (France)
<i>Cheiranthus cheiri</i>		Wallflower	Bedder Primrose	Florensis (France)
<i>Cheiranthus cheiri</i>		Wallflower	Bedder Orange	graines voltz (France)
<i>Matthiola annua</i>		Stock	Super Excelsior Giant	Royalffleur (France)
<i>Matthiola incana</i>		Stock	Mammoth Excelsior	Benary (France)
<i>Armoracia rusticana (Colchearia armoracia)</i>		Horseradish		La Ferme Sainte Marthe (France)
<i>Capsicum annuum</i>		Pepper	cv. Gros carré de Provence	Clause-Tezier (France)
<i>Lycopersicon esculentum</i>		Tomato	Marmande	Vilmorin (France)

Table 3.2: Plants used for the pathogenicity tests

<i>Brassica</i>	Type	Cultivar	Origin	Reaction with <i>X. c. pv. campestris</i> strains ^a	Reaction with <i>X. c. pv. raphani</i> strains ^a
<i>B. oleracea</i>	Savoy cabbage	Wirosa F1	Bejo Graines, France	Susceptible	Susceptible
<i>B. rapa</i>	Turnip	Just Right Hybrid Turnip	USDA, ARS, Plant Genetics resources Unit, US	Resistant to race 4	Resistant to race 1
<i>B. rapa</i>	Turnip	Seven Top Turnip	USDA, ARS, NCGRP, US	Resistant to race 2; variable resistance to race 4	Not used
<i>B. juncea</i>	Japanese mustard	Florida Broad Leaf Mustard	USDA, ARS, Plant Genetics resources Unit, US	Resistant to race 1, 3 et C4	Resistant to race 1
<i>B. oleracea</i>	Cauliflower	Miracle F1	Clause, France	Resistant to race 3	Resistant to race 2
<i>B. carinata</i>	Ethiopian mustard	PI 199947	USDA, ARS, NCRPIS, US	Resistant to races 1, 3, 4	Susceptible

Table 3.3: *Brassica* spp. cultivars used for race typing of *X. c. pv. campestris* and *X. c. pv. raphani* isolates according to Vicente *et al.* (2001, 2006)

runoff. Concentrations were checked by plating 10-fold dilutions on YPGA medium and colony counting. For wounded-leaf inoculation, two leaves per plant were cut on two centimetres on each side of the central vein with sterile scissors and bacterial cultures were applied on wounds with a toothpick. Four plants of each cultivar were tested for each *X. campestris* isolate and for each method of inoculation. Plants were incubated at $26^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ under high relative humidity. The plants were observed daily for symptoms appearance during two weeks.

Several countings were performed to determine the presence or absence of bacterial multiplication in the leaves when observed symptoms were ambiguous. For this purpose, diseased leaves were crushed in sterile water (6 mL per gram of leaves), soaking liquids were plating on YPGA plates, bacterial colonies were counted and the bacterial concentrations were assessed in leaf samples.

3.3 Results

3.3.1 Identification of *X. campestris*

In order to check the identity of the strains of our collection and of bacterial isolates from inoculated plants, we used five couples of primers previously described to be specific to *X. campestris* (Rijlaarsdam *et al.*, 2004; Tsygankova *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005). We obtained the expected DNA amplification with the three couples of primers designed by Tsygankova *et al.* (2004), Park *et al.* (2004) and Berg *et al.* (2005) for all *X. campestris* strains (Table 3.1). We obtained an expected DNA fragment with 38 out of 47 strains of *X. campestris* when we used the two couple of primers designed by Rijlaarsdam *et al.* (2004). A target DNA fragment was amplified from *X. c. pv. campestris* strains as expected because these primers were designed to amplified *X. c. pv. campestris* only (Rijlaarsdam *et al.*, 2004). However, these primers also amplified the target DNA fragment from the two strains

identified as *X. c. pv. aberrans* (CFBP 6863 and CFBP 6865), four of the five strains (CFBP 1371, CFBP 1438, CFBP 2527, CFBP 5686) of *X. c. pv. incanae* and one of the three strains received as *X. c. pv. armoraciae* (CFBP 3838) (Table 3.1). No DNA amplification was observed from any other *Xanthomonas* strains belonging to other species (data not shown).

3.3.2 Pathogenicity determination of *X. campestris* strains

All forty seven *X. campestris* strains were inoculated on ten cultivars of *B. oleracea*, *B. napus*, *B. rapa*, and *B. juncea*, on three cultivars of *Raphanus* sp., on *Armoracia rusticana*, on *Barbarea vulgaris*, on *Iberis* sp., on *Cheiranthus cheiri*, on *Matthiola* sp., on *Capsicum annuum* and *Lycopersicon esculentum* in order to characterize the host range of *X. campestris* pathovars. The strains received as *X. c. pv. aberrans*, *X. c. pv. armoraciae*, *X. c. pv. campestris*, *X. c. pv. incanae* and *X. c. pv. raphani* were pathogenic on cruciferous plants whereas strains of *X. c. pv. barbareae* failed to produce any symptom on all tested plants. Only the three strains of *X. c. pv. raphani* and the *X. c. pv. armoraciae* 756C strain caused lesions on *Capsicum annuum* and *Lycopersicon esculentum* after atomizer inoculation (Table).

Type and cultivars	<i>X. campestris</i> pv. ... ^a																				
	<i>aberrans</i> ^b	<i>campestris</i>										<i>armoraciae</i>	<i>raphani</i>								
	6863 6865	Prof. A ^c	Prof. B ^d	1119	1121	1712	1713	5129	5241	5814	5816	5817	5818	5820	6650	756C	3838	5824	5827	5828	5829
<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> cv. Vert à jets	- v+	v+	-	v+	v+	v+	v+	v+	v+	-	v+	v+	-	v+	v+	ls+	-	-	ls+	ls+	-
<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> cv. Véraline	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	-	-	-	v+	v+	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> cv. Tête de pierre très précocée F1	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	-	v+	v+	v+	v+	v+	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. Géant d'automne primus	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	-	v+	v+	v+	-	v+	ls+	-	-	ls+	-	-
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> cv. Protéor	-	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	-	v+	v+	v+	v+	v+	ls+	-	-	ls+	ls+	-
<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> cv. bartelo	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>B. oleracea</i> <i>Gongylode</i> cv. Hâtif de Vienne	v+	-	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	-	v+	v+	v+	v+	-	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>B. napus</i> var. <i>nepobrassica</i> cv. Jaune champion à collet violet	-	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	ls+	-	-	ls+	ls+	-
<i>B. rapa</i> cv. Demi long blanc dur d'hiver	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	-	v+	v+	v+	v+	v+	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>B. juncea</i> var. <i>rugosa</i> cv. Red Giant	-	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	-	-	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>R. sativus</i> cv. Blanche transparente Race Glaçon	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	-	-	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>R. sativus</i> cv. Rond Gaudry 2	-	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	-	v+	v+	v+	v+	-	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>R. sativus</i> var. <i>niger</i>	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>Armoracia rusticana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ls(+)	-	-	-	-	-
<i>Barbarea vulgaris</i>	-	-	v+	v+	v+	v+	v+	v+	v+	-	v+	v+	v+	v+	v+	nt	-	-	ls+	ls+	-
<i>Iberis</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>Cheiranthus cheiri</i> cv. Bedder Orange	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>Cheiranthus cheiri</i> cv. Bedder Primrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>Matthiola annua</i> cv. Super Excelsior Giant	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+
<i>Matthiola incana</i> cv. Mammoth Excelsior	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Formule Mix	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Capsicum annuum</i> cv. Gros carré de Provence	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Marmande	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ls+	-	-	ls+	ls+	ls+

^a v, vascular infection; ls, leaf spot symptoms; +, compatible interaction; -, incompatible interaction; (+), weakly pathogenic; nt, not tested.

^b pathovar name as received for this study.

^c Profile A groups the strains: CFBP 1124, CFBP 1710, CFBP 1869, CFBP 4952, CFBP 4953, CFBP 4954, CFBP 4956, CFBP 5127, CFBP 5128, CFBP 5130, CFBP 1869, CFBP 6943, HRI 3811, HRI 6181, 147, 277, 305.

^d Profile B groups the strains: CFBP 1711, CFBP 4955, CFBP 5683.

Table 3.4: Host range of *X. campestris* pathovars from cruciferous hosts

X. c. pv. campestris

All strains identified as *X. c. pv. campestris* and *X. c. pv. aberrans* induced typical symptoms of black rot disease of crucifers on *Brassica* sp. and *Raphanus* sp. plants (Figure 3.1.a and 3.1.b). These symptoms consist in V-shaped yellow and/or brown lesions along the leaves margins and eventually in veins blackening (Figure 3.1.b). The black veins appeared more rapidly and more intensely on *B. oleracea* cvs. than on *B. rapa* cvs., *B. napus* cvs., *B. juncea* cvs. and *Raphanus* sp. plants. The symptoms appeared more rapidly and were larger on wounded leaves than on leaves inoculated by spraying. After spraying, the leaves were covered of small dark spots (Figure 3.1.a), which progress toward yellow lesions and typical black rot symptoms appeared all along the leaves margin and sometimes on the centre of a leaf when the leaf was injured.

All strains isolated from *Brassica* sp. identified as *X. c. pv. aberrans* and *X. c. pv. campestris* were pathogenic on several cultivars of *Brassica* sp. and *Raphanus* sp. (Table 3.5). Eighteen out of thirty four strains were pathogenic on all cultivars of *Brassica* sp. and *Raphanus* sp. Fifteen strains were pathogenic on at least eight of the thirteen *Brassica* sp. and *Raphanus* sp. cultivars tested. Three strains (CFBP 5814, CFBP 5820, CFBP 6650) caused symptoms on *R. sativus* var. *niger* but not on the two other cultivars of *Raphanus* sp. The strain CFBP 5814 was the less virulent as it caused symptoms on five out of thirteen cultivars only. Two cultivars were susceptible to all strains: *B. oleracea* var. *capitata* cv. *Bartolo* and *R. sativus* var. *niger*. Most of the strains (twenty nine out of thirty four) of *X. c. pv. campestris* and *X. c. pv. aberrans* were pathogenic on *Barbarea vulgaris*. The symptoms observed on *Barbarea vulgaris* were the same as those observed on *Brassica* sp. and *Raphanus* sp. Only two strains of *X. c. pv. campestris* (CFBP 1712 and CFBP 5241) were pathogenic on *Iberis* sp. The strains of *X. c. pv. campestris* and *X. c. pv. aberrans* did not induced any symptom on other tested plants such as *Armoracia rusticana*, *Cheiranthus*

3.3 Results

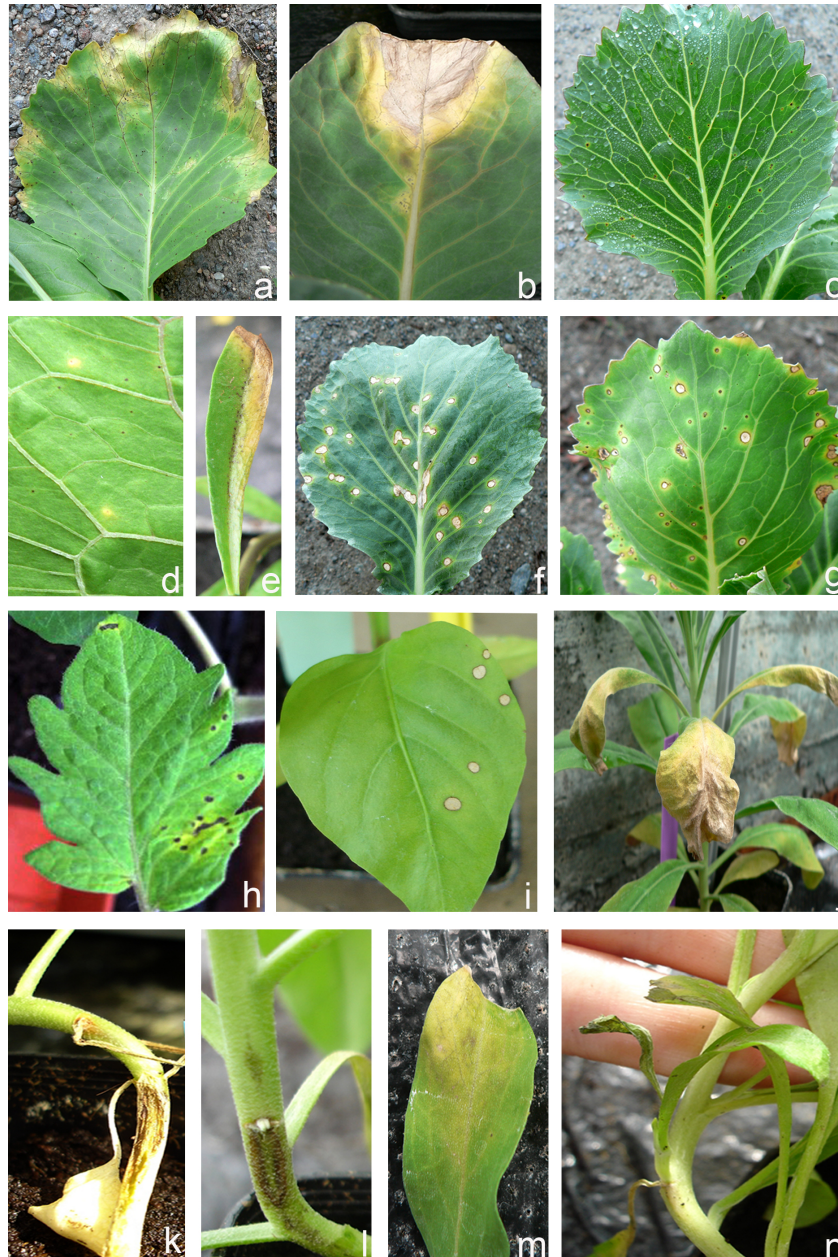


Figure 3.1: Symptoms induced by the *Xanthomonas campestris* pathovars
 (a) Small dark spots with typical V-shaped lesions and black veins on *B. oleracea* var. *capitata* cv. Bartolo caused by *X. c.* pv. *campestris* and *X. c.* pv. *aberrans* after spray inoculation. (b) Typical V-shaped lesions with black veins on *B. oleracea* var. *capitata* cv. Bartolo caused by *X. c.* pv. *campestris* and *X. c.* pv. *aberrans*. (c) Leaf spot symptoms induced by *X. c.* pv. *armoraciae* (CFBP 5824) on *B. oleracea* var. *capitata* cv. Bartolo. (d) Leaf spot symptoms induced by *X. c.* pv. *armoraciae* CFBP 5824 on *Armoracia rusticana*. (e) Blackened veins on *Iberis* sp. caused by *X. c.* pv. *armoraciae* CFBP 3838. (f) Necrotic spot lesions on *B. oleracea* var. *capitata* cv. Bartolo by *X. c.* pv. *armoraciae* (756C). (g, h and i) Necrotic spot lesions on *B. oleracea* var. *capitata* cv. Bartolo, *Lycopersicon esculentum* and *Capsicum annuum* respectively, caused by *X. c.* pv. *raphani*. (j) Blight on leaves induced on *Matthiola* sp. by *X. c.* pv. *incanae* (CFBP 2527). (k and l) Black canker on stem caused on *Matthiola* sp. by *X. c.* pv. *incanae* (CFBP 2527 and CFBP 1371 respectively). (m and n) blight on *Cheiranthus cheiri* leaves induced by *X. c.* pv. *incanae* (CFBP 1606).

cheiri, *Matthiola* sp., *Capsicum annuum* and *Lycopersicon esculentum*.

X. c. pv. raphani

The three strains received as *X. c. pv. raphani* tested (CFBP 5827, CFBP 5828 and CFBP 5829), induced typical necrotic spot lesions on leaves after spraying a bacterial suspension (Figure 3.1.g, 3.1.h and 3.1.i). *X. c. pv. raphani* strains were pathogenic on *Raphanus* sp., on *Cheiranthus cheiri*, on *Iberis* sp., on *Capsicum annuum* (Figure 3.1.i) and on *Lycopersicon esculentum* (Figure 3.1.h). They caused no symptom on *Armoracia rusticana* and *Matthiola* sp. plants. Initially, spots appeared as small circular black dots, and then the lesions grown as circular burned, at times surrounded by a yellowish zone. Occasionally, these necrotic spots perforated the leaves. *X. c. pv. raphani* strains displayed a wide host range (Table 3.5). The strain CFBP 5827 was pathogenic on all plants of *Brassica* sp. and on *Barbarea vulgaris* tested. The strain CFBP 5828 caused symptoms on *Brassica* sp. plants except on *B. oleracea* var. *botrytis* cv. Géant d'automne primus, on *B. rapa* cv. Demi-long blanc dur d'hiver, on *B. juncea* var. *rugosa* cv. Red Giant and on *Barbarea vulgaris*. The strain CFPB 5829 was less virulent; it was pathogenic on *B. oleracea* var. *gemmifera* cv. Véraline, on *B. oleracea* var. *capitata* cv. tête de Pierre très précoce F1, on *B. oleracea* var. *capitata* cv. Bartolo, on *B. oleracea* Gongylodes cv. Hâtif de Vienne on *B. rapa* cv. Demi-long blanc dur d'hiver and on *B. juncea* var. *rugosa* cv. Red Giant. The all three strains caused the same type of symptoms on *Capsicum annuum* and on *Lycopersicon esculentum*.

X. c. pv. armoraciae

The three strains received as *X. c. pv. armoraciae* (756C, CFBP 3838, CFBP 5824) produced different symptoms on plants. The strain CFBP 5824, the only strain isolated from *Armoracia rusticana*, was not pathogenic. After spaying, this strain caused small leaf spots with sometimes a yellow margin

3.3 Results

on *B. oleracea* var. *capitata* cv. Bartolo (Figure 3.1.c), on *R. sativus* var. *niger* and on *Armoracia rusticana* (Figure 3.1.d). However, we recovered the bacteria at very low concentrations into leaves (10^4 cfu per leaf), 14 days after inoculation when spots were visible (data not shown). These spots were observed only when inoculated plants were cultivated under 100% humidity in the atmosphere. The strain CFBP 3838, isolated from *Iberis* sp. was only pathogenic on *Iberis* sp. and it induced yellow lesions and black veins leaves symptoms (Figure 3.1.e) identical to symptoms caused by *X. c.* pv. *campestris* strains on *Iberis* sp., *Brassica* sp. and *Raphanus* sp. Furthermore, no symptom was observed on *Armoracia rusticana*. We conclude that this strain (CFBP 3838) is misidentified and should be renamed *X. c.* pv. *campestris*. On the opposite, the third strain 756C induced the typical symptoms of leaf spot disease of *Brassicaceae* sp. on the same host range. This strain induced the same type of symptoms caused by *X. c.* pv. *raphani*: circular necrotic spot lesions on leaves after spraying a bacterial suspension. Small circular black dots appeared 4-5 days after inoculation and later, the spots grown as circular burned, sometimes surrounded by yellowish zones (Figure 3.1.f). This strain was also pathogenic on *Brassica* sp., *Raphanus* sp., *Iberis* sp., *Cheiranthus cheiri* and on the two non cruciferous plants: *Cap-sicum annuum* and *Lycopersicon esculentum*. It also caused small necrosis on *Armoracia rusticana*.

X. c.* pv. *incanae

The five strains identified as *X. c.* pv. *incanae* were isolated from ornamental cruciferous plants and were pathogenic only on *Matthiola* sp. or on *Cheiranthus cheiri*. The lesions produced on both plants were typical of bacterial blight, yellowing and wilt of leaves (Figure 3.1.j, 3.1.m and 3.1.n), but the development of black necrosis on stems that evolved in cankers was observed only on *Matthiola* sp. (Figure 3.1.k and 3.1.l). The black necrotic lesions spread up and down along the stems; then all leaves wilted and the plants

died rapidly. Four strains (CFBP 1371, CFBP 1438, CFBP 2527 and CFBP 5686) were pathogenic only on *Matthiola* sp. and one strain (CFBP 1606) was pathogenic on *Cheiranthus cheiri* only.

3.3.3 Race determination within *X. c. pv. campestris*

A postulated gene-for-gene model to explain the relationship between races and cultivars has been previously described by Vicente *et al.* (2001) within *X. c. pv. campestris* according to their virulence on a range of differential cruciferous cultivars. The model presented is the simplest hypothesis involving the smallest number of genes (two matching gene pairs) necessary to explain the observed interactions. In this hypothesis, although not tested, gene homology was assumed for cultivars with the same pattern of reaction. We used the same range of cultivars to challenge our collection of strains of *X. campestris*. Strains identified as *X. c. pv. campestris* and *X. c. pv. aberrans* were distributed into nine patterns that led us to propose nine races (Table 3.5). This new scheme was constructed with no addition of new avirulence genes in bacterial genotypes or resistance genes in plant genotypes to those proposed in the scheme designed by Vicente *et al.* (2001). Eleven strains belonged to race 1. These strains were isolated from Belgium, Ivory Coast, France, Spain and USA (Table 3.1). Only one strain belonged to race 2 (Clause 305). This strain has been used as the representative strain of race 2 by Clause-Tezier in breeding programs in order to obtain resistant lines (V. Grimault, Clause-Tezier laboratory, Angers, France, personal communication). Only two strains were identified as race 3: the type strain of *X. campestris* (CFBP 5241 = NCPPB 528) which is in accordance with the data obtained by Vincente *et al.* (2001), and the strain CFBP 5683 isolated in France from *B. oleracea* var. *botrytis*. Four strains showed the virulence pattern of the race 4. The strain 277 displayed a clear and typical pattern of race 4 and the three other strains (CFBP 4956, CFBP 5817 and Xcc 147) as well; however we observed that these last strains caused weak symptoms on

PI 199947 *B. carinata*. These symptoms were clearly different and weaker than the ones caused by strains that belong to other races. Therefore, we placed these strains into the race 4 (Table 3.1). Three strains (CFBP 1712, CFBP 1713, and CFBP 6865) belonged to the race 5. Three strains of *X. c. pv. campestris* (CFBP 4954, CFBP 6943 and HRI 6181) belonged to the race 6. As expected, the two common strains from the work reported by Vicente *et al.* (2001) and this study (HRI 3811 and HRI 6181) belonged to race 1 and race 6 respectively.

Ten strains displayed an incompatible pattern with the scheme described by Vicente *et al.* (2001) and lead us to propose three additional races. Two strains (CFBP 4953 and CFBP 5130) isolated from *B. oleracea* sp. were pathogenic to all accessions excepted *B. juncea* cv. Florida Broad Leaf Mustard. The interaction between the avirulence gene A5 and the resistance gene R5, only carried by *B. juncea* cv. Florida Broad Leaf Mustard, could explain this result. Then, we proposed that these strains belong to the race 7. Five strains (CFBP 6863, CFBP 1124, CFBP 1710, CFBP 1711 and CFBP 5820) isolated from *B. oleracea* sp. were pathogenic on two accessions only, *B. oleracea* cv. Wirosa F1 and *B. rapa* cv. Just Right Hybrid Turnip. This result could be explained by the presence of three avirulence genes A1, A2 and A3 in these strains. Then, we propose that these strains belong to the race 8. Finally, three strains (CFBP 4955, CFBP 5814 and CFBP 6650) isolated from *B. oleracea* sp. were pathogenic on *B. oleracea* cv. Wirosa F1 only. Hence, we propose that these strains, carrying the three avirulence genes A1, A3 and A4 belong to the race 9.

3.3.4 Race determination within *X. c. pv. raphani*

Recently, Vicente *et al.* (2006) described three races within *X. c. pv. raphani* based on their virulence on a range of differential cultivars of cruciferous plants. According to this gene-for-gene model, we determined that the pathotype strain (CFBP 5827) and the three other strains (CFBP 5828, CFBP 5829 and 756 C) belonged to the race 3 (3R on Table 3.1).

	Races / Avirulence gene (A)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Differential cultivars	A1	...	A1	A1	A1
Wirosa F1 (<i>B. oleracea</i>)	A1 ^a	A2	...
Just Right Hybrid Turnip (<i>B. rapa</i>)	A3	A2	A3
Seven top Turnip (<i>B. rapa</i>)	...	A3	A3	A2	A3
PI 199947 (<i>B. carinata</i>)	A4	A4
Florida Broad Leaf Mustard (<i>B. juncea</i>)	A5	...	A5
Miracle F1 (<i>B. oleracea</i>)
# of strains	11	1	2	4	3	3	2	5	3
Resistance genes (R)	R3
Wirosa F1 (<i>B. oleracea</i>)	+	+	+	+	+	+
Just Right Hybrid Turnip (<i>B. rapa</i>)	+	+	+	+	+	+
Seven top Turnip (<i>B. rapa</i>)	+	+	+	+	+	+
PI 199947 (<i>B. carinata</i>)	R1	-	-/(+) ^e	+	+	+	-
Florida Broad Leaf Mustard (<i>B. juncea</i>)	R1	-	-	+	+	-	-
Miracle F1 (<i>B. oleracea</i>)	+	+	+	+	+	-

^a A1? possible presence of avirulence gene A1 (Vicente *et al.*, 2001)

^b + compatible interaction (susceptibility)

^c - incompatible interaction (resistance)

^d R4? possible presence of resistance gene R4 (Vicente *et al.*, 2001)

^e (+) possible presence of resistance gene R4

Table 3.5: The postulated gene-for-gene model for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* of Vicente *et al.* (2001) with the additional races obtained in this study

3.4 Discussion

3.4.1 Identification of *X. campestris* by PCR

Bacterial species are presently defined through direct comparison of genome pairs by DNA/DNA hybridization studies leading to the concept of genomic species (Wayne *et al.*, 1987). The *Xanthomonas campestris* species, Vauterin *et al.* (1995), was defined according to this criterion and groups bacteria that cause diseases on cruciferous plants. The fact that all *Xanthomonas* strains in interaction with cruciferous plants belong to the same species suggests that cruciferous plants and *X. campestris* have co-evolved for a long time. Five couples of primers specific to *X. campestris* or *X. c.* pv. *campestris* were designed either from the genomic sequence of the *hrpF* gene (Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005) coding the protein that formed the translocon of Xanthomonads type III secretion system (Rossier *et al.*, 2000; Szurek *et al.*, 2002) or from random selected fragments of DNA obtained after rep-PCR analysis (Tsygankova *et al.*, 2004) and AFLP analysis (Rijlaarsdam *et al.*, 2004). All strains of *X. campestris* were detected with three sets of primers out of five, even the strains that were not pathogenic on any cruciferous plant tested (*X. c.* pv. *barbareae*). It indicates that all these strains belong really to *X. campestris*. Consequently, it makes these sets of primers good tools for the rapid identification of the *X. campestris* species. The two other set of primers designed by Rijlaarsdam *et al.* (2004) displayed a narrow range of detection. Using a larger collection of *X. campestris* strains, we found that this target DNA sequence was not specific to *X. c.* pv. *campestris* as Rijlaarsdam *et al.* reported (2004). It was also detected in strains of *X. c.* pv. *incanae* that were pathogenic on *Matthiola* sp. (CFBP 1371, CFBP 1438, CFBP 2527 and CFBP 5686) but not in the strain of *X. c.* pv. *incanae* pathogenic on *Cheiranthus cheiri* (CFBP 1606). Ornamental cruciferous plants gather heterogeneous botanical plants and strains of *X. campestris* isolated from these ornamental cruciferous plants are probably

more polymorphic than strains of *X. c. pv. campestris* as well. No DNA fragment was amplified from the *X. c. pv. raphani* strains and from the *X. c. pv. armoraciae* strains except from the strain CFBP 3838 isolated from *Iberis* sp. This strain is certainly not relative to other strains received as *X. c. pv. armoraciae* as we will discuss below. None of these primer sets was then considered as pathovar-specific; however, they provide help for the rapid identification of pathovar in *X. campestris* when used in combination and revealed the occurrence of a genomic diversity within *X. campestris*.

3.4.2 Identification of pathovars

Early, some authors (Alvarez *et al.*, 1994; Vauterin *et al.*, 1995; Vicente *et al.*, 2001, 2006) expressed doubts on the accuracy of certain pathovars (*pv. aberrans* and *pv. armoraciae*). The objective of this study was to clarify the taxonomy of *X. campestris* species. The symptoms observed after inoculation of the forty seven strains of *X. campestris* showed that these bacteria caused three different diseases.

The first one, the black rot of crucifers is considered as the most important disease of crucifer worldwide (Williams, 1980). The typical symptoms of this disease are caused by strains received as *X. c. pv. campestris* and *X. c. pv. aberrans* as well. Thus, we support the proposition made by Vicente *et al.* (2001) to include *X. c. pv. aberrans* in *X. c. pv. campestris*. *X. c. pv. aberrans* was first described by Knösel in 1961. The two strains identified as *X. c. pv. aberrans* and available in collections of plant pathogenic bacteria, caused black rot symptoms on *Brassica* sp. and *Raphanus* sp. Therefore these two strains CFBP 6865 (NCPBP 2986, ICMP 4805) and CFBP 6863 (NCPBP 875) should be renamed as *X. c. pv. campestris*.

The second one, the leaf spot disease of crucifers, is characterized by symptoms different to those caused by *X. c. pv. campestris*. The parenchyma of leaves and stems are affected. The typical symptoms of this disease is caused by *X. c. pv. raphani*. The strains of *X. c. pv. raphani* displayed a

wider host range as it caused typical symptoms on *Lycopersicon esculentum* and *Capsicum annuum* and it was even reported to be pathogenic on *Nicotiana tabacum* (tobacco) (White, 1930). In our hands, the pathotype strain of *X. c. pv. raphani* (CFBP 5827) displayed the typical symptoms of leaf spots on the all range of plants susceptible to *X. c. pv. raphani*. This is in opposition with what was reported by Vicente *et al.* in 2006 when they showed that this strain does not cause the leaf spot disease described by White (1930). Vicente *et al.* (2001, 2006) and us probably did not work with the same clone of the pathotype strain identified as *X. c. pv. raphani* CFBP 5827 (LMG 860, NCPPB 1946). In their study, rep-PCR-based genomic fingerprinting was used to assess the genetic diversity of the leaf spot isolates; they observed that this strain was genetically distinct from the other *X. c. pv. raphani* and close to *X. c. pv. campestris*. On the opposite, Rademaker *et al.* (2005) performed the same rep-PCR analysis on Xanthomonas strains including the CFBP 5827 (LMG 860, NCPPB 1946) and they found this strain outside the group of *X. c. pv. campestris*. We were unable to say clearly who have the right pathotype strain of *X. c. pv. raphani* CFBP 5827 (LMG 860, NCPPB 1946), but our results and those obtained by Rademaker *et al.* (2005) are more consistent.

The third one, the bacterial blight of garden stocks, was observed on *Matthiola* sp. and *Cheiranthus cheiri*. Our results are in agreement with the description of Kendrick and Baker (1942). All studied strains were isolated from ornamental cruciferous plants one strain was pathogenic on *Cheiranthus cheiri* only and the four other, on *Matthiola* sp. Isolates pathogenic on *Matthiola* sp. and *Cheiranthus cheiri* are closely related because they provoke leaf wilt on both plants and should be included in *X. c. pv. incanae* as suggested by Bradbury (1986) rather than to create a new pathovar as proposed by Vicente *et al.* (2001). A host specificity exists within *X. c. pv. incanae* and could be explained by the occurrence of races, as it was observed within *X. c. pv. campestris* and within *X. c. pv. raphani* (Vicente *et al.*,

2001, 2006).

Strains identified as *X. c. pv. armoraciae* displayed different types of interaction with cruciferous plants that indicate these strains have been misidentified and must be renamed. The strain 756C has all characteristics of *X. c. pv. raphani*. It causes typical symptoms of leaf spots of crucifers and has the same typical host range of the other strains of this pathovar. Indeed, this strain is not detected by PCR with the primer sets described by Rijlaarsdam *et al.* (2004). It is very important that this strain is correctly identified because it is the strain whose the complete genome is under sequencing and thus this isolate will be used extensively in future molecular studies. The strain CFBP 3838, isolated from *Iberis* sp., was identified as *X. c. pv. armoraciae*. It was designed as the pathotype strain for *X. c. pv. armoraciae*. This strain was not well chosen to be the representative strain of *X. c. pv. armoraciae* because this strain was not isolated from *Armoracia* sp., but from an unrelated plant: *Iberis* sp. Furthermore, this strain was not pathogenic to *Armoracia rusticana* and the symptoms caused on *Iberis* sp., its host plant, was not a necrosis of leaf parenchyma but a black rot of veins typical of *X. c. pv. campestris*. Moreover, two *X. c. pv. campestris* strains CFBP 1712 and CFBP 5241 caused exactly the same symptoms on *Iberis* sp. as the strain CFBP 3838. This indicates that the disease caused by the strain CFBP 3838 is not different to the black rot disease of crucifers. In addition, the strain CFBP 3838 is amplified by the primers designed by Rijlaarsdam *et al.* (2004) which reveals a genomic relationship with *X. c. pv. campestris*. In phylogenetic analyses of *Xanthomonas* genus by rep-PCR, Rademaker *et al.* (2005) and Vicente *et al.* (2006) showed that the strain CFBP 3838 grouped with *X. c. pv. campestris* strains. Vicente *et al.* (2006) suggested that this strain should be considered as a new pathovar of *X. campestris* and should not be designated anymore as the pathotype strain of *X. c. pv. armoraciae*. We agree with Vicente *et al.* (2006) that this strain is misidentified. Nevertheless, our results support the hypothesis that this strain should be

3.4 Discussion

considered as a strain of *X. c.* pv. *campestris* with a particular host range restricted to *Iberis* sp. The third strain received as *X. c.* pv. *armoraciae* is the strain CFBP 5824. This strain caused leaf spots when it was sprayed on *B. oleracea* var. *capitata* cv. Bartolo or *R. sativus* var. *niger* but the symptoms were observed only when the atmosphere was saturated in humidity. The bacterial populations were at very low concentrations in plants (data not shown). The first report of the leaf spot disease caused by *X. c.* pv. *armoraciae* was done by McCulloch and was observed on *Armoracia rusticana* (McCulloch, 1929). It was reported that this pathogen was weakly pathogen on *B. oleracea* and a few other crucifers and that, when symptoms were obtained, it was difficult to isolate the pathogen from those symptoms (McCulloch, 1929). Indeed, this author suggested that the scarcity of bacteria in the lesions may be more due to physical or chemical causes. We think that the spots observed were the result of an incompatible reaction between the plant and the bacteria which is typical of a hypersensitive reaction. It would be more accurate to name this strain *X. campestris* than *X. c.* pv. *armoraciae* because there is no evidence of a compatible interaction with *Armoracia rusticana*. Hence, we do not support the existence of another leaf spot disease caused by *X. c.* pv. *armoraciae*.

The two strains isolated from *Barbarea vulgaris* have been identified as *X. c.* pv. *barbareae*. The observation of a PCR amplification of a *X. campestris* specific DNA fragment with primer sets designed by Park *et al.* (2004), Berg *et al.* (2005) and Tsygankova *et al.* (2004) supports the identity of these strains to *X. campestris* species. Burkholder (1941) described the symptoms caused by *X. c.* pv. *barbareae* as black rot symptoms on leaves and small spots at first green and water soaked and later blackish that extended down to the stem and killed leaves. We observed such symptoms neither on *Barbarea vulgaris*, nor on other plants. Actually, no study has been reported on the black rot of *Barbarea vulgaris* since 1941. We think that the lack of disease symptoms may be due to the use of resistant accession in the pathogenicity

tests. The two strains were isolated from *Barbarea vulgaris*, a weed, in New York, USA (Burkholder, 1941) whereas seeds that we used to raise plants for pathogenicity tests were collected in Switzerland. The genetic structure of this plant is still poorly documented and we do not have information on host range of *X. campestris* within *Barbarea vulgaris* species. Because of the lack of symptom occurrence on any plant, we propose to name these strains *X. campestris*.

3.4.3 Nine races of *X. c. pv. campestris* and three races of *X. c. pv. raphani* displayed differential responses on Brassica cultivars.

The pathogenicity tests with differential cultivars in order to classify *X. c. pv. campestris* into races indicated that this pathovar can be divided into nine races. Three new races were added to the scheme described by Vicente *et al.* (2001) because ten out of thirty four strains of *X. c. pv. campestris* displayed new virulence patterns. No new avirulence gene in bacterial genotypes and no resistance gene in plant genotypes was added to those proposed in the gene-for-gene model from Vicente *et al.* (2001). The race 7 differed to the race 6 on the reaction of *B. juncea* cv. Florida Broad Leaf Mustard. Vicente *et al.* (2001) have proposed that this cultivar has potentially three resistance genes R1, R4 and one additive gene that we propose to call R5. A single corresponding avirulence gene A5 in the race 7 would explain the incompatibility between race 7 strains and the *B. juncea* cv. Florida Broad Leaf Mustard. We propose the strain CFBP 4953 as the race 7 type strain. This race is probably equivalent to a race described by Castañeda *et al.* (2005). They introduced into a race 6 strain (HRI 6181) a plasmid containing the *avrXccFM* gene (249243662493431 of NC_003902). The presence of this plasmid caused a change in race pattern. The transformant became avirulent on *B. juncea* cv. Florida Broad Leaf Mustard. Therefore, the avirulence gene

A5 could correspond to the *avrXccFM* gene. The presence of this gene in race 7 strains should be tested to assess this hypothesis. The two other new races 8 and 9 have possibly three avirulence genes which conferred a weak virulence on cruciferous plants. The race 8 strains were pathogenic on *B. oleracea* cv. Wirosa F1 and *B. rapa* cv. Just Right Hybrid Turnip only. Five strains out of thirty two belongs to race 8, they were isolated in Germany and in France. We propose the strain CFBP 1124 as the race 8 type strain. The race 9 strains were pathogenic only on *B. oleracea* cv. Wirosa F1. We propose the strain CFBP 6650 as the race 9 type strain. The genome of this strain was completely sequenced (Qian *et al.*, 2005). The other genome sequenced strain is the strain CFBP 5241 that belongs to the race 3 (da Silva *et al.*, 2002). These two races have the putative avirulence genes A1 and A3 in common when the putative avirulence gene A4 is present in the strain CFBP 6650 (race 9). All strains of races 7, 8 and 9 were not included in the study published by Vicente *et al.* (2001) except the strains CFBP 6650 and CFBP 6863 which were included in the “weak or non-pathogenic” group. These two last new races grouped strains which were not very pathogenic on *Brassica* cultivar used for the race typing and the reliability of the observation might be questionable. It is sometimes reported that long-term maintenance of isolates can lead to loss virulence, but it is not the case in this study because, all strains have been freeze-dried for long term conservation and not frequently sub-cultured. Furthermore, all strains were pathogenic at least on some of *Brassica* cultivars used for the host range identification. In addition, the results of race typing were replicated at least three times and were reproducible.

A polymorphism in plant response was observed within races 1, 3, 4, 8 and 9 when the pathogenicity was tested on a large range of cruciferous plants including *Brassica* sp. (Table 4). It suggests that more races could be described within *X. c. pv. campestris* if the differential cultivars used for race typing was completed with the cultivars used for host range identification.

Furthermore genetics studies of resistance inheritance would be needed to validate the gene for gene relationship.

Three races were defined within *X. c. pv. raphani* by Vicente *et al.* (2006). Three strains identified as *X. c. pv. raphani* were distributed into races according to differential pattern of virulence. In their study, Vicente *et al.* (2001, 2006) classified the pathotype strain of *X. c. pv. raphani* (CFBP 5827) as race 5 because they identified this strain as *X. c. pv. campestris*. We identified this strain CFBP 5827 as *X. c. pv. raphani* and we found that it belongs to the race 3 for *X. c. pv. raphani* (Vicente *et al.*, 2006). The strain 756C for which the genome sequence will be soon available, displayed a race 3 pattern of virulence, as well.

To conclude we observed three diseases caused by *X. campestris*, the black rot caused by *X. c. pv. campestris* on cruciferous plants; the leaf spot disease caused by *X. c. pv. raphani* on hosts belonging to the Cruciferae family and some of the Solanaceae family and the bacterial blight caused by *X. c. pv. incanae* on ornamentals crucifers (*Matthiola* sp. and *Cheiranthus cheiri*). Leaf spot disease was not observed on *Barbarea vulgaris* after inoculation of strains identified as *X. c. pv. barbareae* and, we cannot conclude that this disease and this pathovar do exist until we have observed symptoms on a ecotype of *Barbarea vulgaris*. Concerning the bacterial leaf spot of horse-radish, there are no strain of *X. c. pv. armoraciae* anymore available in bacterial collections to induce the disease described by McCulloch (1929). The bacteria extensively analysed for pathogenicity in this study form a reference panel useful for further phylogenetic studies within *X. campestris*.

Acknowledgements

This work was supported by INRA, GEVES and the “Programme semence” founded by the Région Pays de la Loire, the Conseil General du Maine-et-Loire and Angers Loire Métropole. E. Fargier was supported by a grant from GEVES, France. We thank LIPM, Toulouse, France and Clauze Tezier,

3.4 Discussion

Angers, France for supplying some strains. We thank Liciniu Dragos for providing *Barbarea vulgaris* seeds. We also acknowledge Damien Meyer and Stéphane Poussier for critical reading of the manuscript.

Chapitre 4

Étude de la diversité génétique de l'espèce *X. campestris*

Contexte scientifique

La faculté d'identifier avec exactitude les souches infectieuses d'une espèce bactérienne est capitale pour la surveillance épidémiologique, et pour mettre au point des stratégies de lutte contre les maladies. Dans le cas particulier des bactérioses provoquées par l'espèce *X. campestris*, l'un des moyens de lutte les plus efficaces est de s'assurer de l'état sanitaire des plants ou des semences produits. Mais il est indispensable, avant tout, de pouvoir distinguer les différents pathovars et les races de cette espèce afin de mettre au point ces stratégies de lutte. Ainsi, de nombreux travaux ont été réalisés pour les identifier sans pour autant passer par des tests de pouvoir pathogènes, en déterminant leurs profils moléculaires par RFLP, AFLP ou rep-PCR (Alvarez *et al.*, 1994 ; Zhao *et al.*, 2000 ; Massomo *et al.*, 2003 ; Tsygankova *et al.*, 2004 ; Vicente *et al.*, 2006 ; Valverde *et al.*, 2007). Ces études ont mis en évidence l'existence d'une grande diversité au sein de l'espèce et des pathovars. Néanmoins, ces méthodes ne sont pas totalement satisfaisantes car aucune n'est parvenue à proposer un outil de diagnostic efficace pour identifier les

pathovars.

Les techniques de typage des souches basées sur l'obtention de profils moléculaires souffrent de nombreux inconvénients : elles manquent parfois de pouvoir discriminant, ont une faible reproductibilité. Le problème majeur de ces techniques est la difficulté de comparer les résultats entre les laboratoires (Maiden *et al.*, 1998).

Depuis 1998, une nouvelle méthode de typage moléculaire basée sur le séquençage multiple de gènes, la MLST (Multi Locus Sequence Typing) (Maiden *et al.*, 1998), a supplanté toutes les autres en raison de son fort pouvoir discriminant. Comme la MLST utilise des séquences nucléotidiques, les données collectées sont aisément échangeables entre les différents laboratoires, notamment via des sites web qui lui sont entièrement consacrés, tant pour l'analyse que pour la collection des données de séquences (<http://www.mlst.net/> ou <http://pubmlst.org/>). La MLST permet d'évaluer les relations génétiques entre les individus, de mesurer leur diversité et d'établir la structure des populations (Maiden, 2006). Elle est rapidement devenue la meilleure technique de typage moléculaire et utilisée pour une large gamme de bactéries pathogènes comme *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998), *Staphylococcus aureus* (Enright *et al.*, 2000) ou *Porphyromonas gingivalis* (Enersen *et al.*, 2006) et non pathogènes comme Medicago-nodulating rhizobia (van Berkum *et al.*, 2006).

Par convention, sept gènes sont séquencés et analysés pour caractériser les souches à l'intérieur d'une espèce. Chaque séquence différente (allèle) est assignée à un nombre et chaque souche est définie par une suite de sept nombres entiers, correspondant aux numéros d'allèles pour chacun des sept gènes. Cette suite de nombres est appelée profil allélique ou sequence type (ST). Les relations entre les souches et la structure de la population sont établies en constituant des groupes suivant leurs profils alléliques (Maiden *et al.*, 1998 ; Hanage *et al.*, 2006).

Les gènes utilisés en MLST sont généralement des gènes de ménages —

gènes codant pour des protéines essentielles à la survie de l'organisme. Ils ont l'avantage d'être au moins présents chez toutes les souches du genre et seraient également moins sujets aux transferts de gènes horizontaux. Ils évoluent relativement lentement et la plupart des variations accumulées sont considérées comme sélectivement neutres, c'est-à-dire non soumises à une pression de sélection. Ainsi, les différences entre les individus peuvent être directement interprétées pour évaluer leurs relations phylogénétiques (Hahnage *et al.*, 2006).

L'extension de l'approche MLST à des fins phylogénétiques ou pour étudier les relations entre des souches appartenant à des espèces différentes a été nommée MLSA (Multilocus Sequence Analysis) (Gevers *et al.*, 2005). Les séquences concaténées des gènes de ménages sont utilisées pour explorer les relations entre les individus. Elles ont l'avantage de limiter les effets déformants de la recombinaison (Gevers *et al.*, 2005). La MLSA a été particulièrement utilisée pour établir la position phylogénétique de nouvelles espèces (Christensen *et al.*, 2004; Holmes *et al.*, 2004) ou étudier les relations entre espèces au sein d'un genre (Wertz *et al.*, 2003).

L'un des aspects les plus intéressants de la MLST est sa capacité à détecter et à mesurer la recombinaison (Feil *et al.*, 1999; 2000). Les recombinaisons ont eu une influence importante sur l'histoire évolutive des bactéries (Awa-dalla, 2003) et notamment des *Xanthomonas* (da Silva *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2005; Comas *et al.*, 2006). Elles causent généralement une diversification rapide des clones lorsque du matériel génétique provenant d'une lignée éloignée est introduit. En redistribuant les variations génétiques, la recombinaison crée de nouveaux génotypes qui pourront être mieux adaptés à un hôte ou à un environnement particulier. Mesurer l'importance de la recombinaison est indispensable pour comprendre d'une part la manière dont les populations bactériennes évoluent, s'adaptent à un nouvel environnement et aux contraintes de l'hôte, et d'autre part l'origine de nouvelles souches pathogènes.

Au terme de notre étude sur le pouvoir pathogène des différentes souches de notre collection, nous avons pu conclure en premier lieu que l'espèce *X. campestris* est subdivisée en trois pathovars, suivant le type de symptômes qu'ils induisent sur leur gamme d'hôtes, et, en second lieu, qu'elle comprenait des souches pour lesquelles nous n'avions pu déterminer d'hôtes sensibles (Fargier and Manceau, 2007). Nos travaux, complémentaires à ceux de Vicente *et al.*, (2001) et Kamoun *et al.*, (1992), montrent également que *X. c. pv. campestris* peut être subdivisé en au moins neuf races, suivant leur virulence sur différentes espèces et cultivars. Trois races avaient été décrites au sein de *X. c. pv. raphani* (Vicente *et al.*, 2006).

Notre second objectif consistait à étudier la diversité génétique par MLST / MLSA des souches de *X. campestris* de notre collection — caractérisées dans leur pouvoir pathogène — afin de déterminer si la classification basée sur le pouvoir pathogène est pertinente et si elle reflète les relations génétiques existant entre les individus de cette espèce. Nous voulions également connaître quelles étaient les différentes sources de polymorphisme créatrices de diversité dans cette espèce (recombinaison ou mutation).

Ces travaux font l'objet d'un article intitulé « *Recombination and point mutation contribute to the high genetic diversity of Xanthomonas campestris (Vauterin et al., 1995) and to the complex structure of pathovars* » prochainement soumis dans la revue internationale *Molecular Plant Pathology*. Les principales conclusions sont rapportées dans le résumé ci-dessous.

Notre analyse montre que l'espèce *X. campestris* aurait une structure clonale en raison d'une étroite communauté d'hôtes. Parmi les 42 souches de l'espèce *X. campestris* étudiées, 23 profils alléliques différents ont été obtenus, avec un profil majoritaire rassemblant les souches de *X. c. pv. campestris* de race 1. Toutes les souches provoquant de la nervation noire se sont révélées être très proches génétiquement, réaffirmant la nécessité de les regrouper sous le nom de *X. c. pv. campestris*. Notre analyse a confirmé également la synonymie entre les *X. c. pv. armoraciae* et *X. c. pv. raphani*. Néanmoins,

ce groupe particulièrement polymorphe ne constitue pas une lignée génétique bien identifiée. Les souches pour lesquelles nous n'avions pu déterminer d'hôte sensible ainsi que les *X. c. pv. incanae* ont été regroupées ensemble. Il n'existerait aucun lien entre les groupes génétiques obtenus, le lieu d'isolement des souches et l'appartenance à une race.

Notre étude montre qu'il existe une grande diversité au sein de cette espèce. Ce fort polymorphisme aurait deux origines d'importance similaire : l'une apportée par une accumulation de mutations et l'autre par des événements de recombinaison entre les individus au sein de l'espèce *X. campestris*.

Recombination and point mutation contribute to the high genetic diversity of *Xanthomonas campestris* (Vauterin *et al.*, 1995) and to the complex structure of pathovars

E. Fargier^{1,2}, M. Fischer Le Saux¹ and C. Manceau¹

4.1 Introduction

The term pathovar was established to help plant pathologists to name pathogens that are specific for certain diseases (Young *et al.*, 1978; Dye *et al.*, 1980). This special proposed classification was adopted as a provisional solution until a classification would be established based on more generally accepted principles: define taxa on the basis of their genealogical relationships. The *Xanthomonas campestris* (Vauterin *et al.*, 1995) species includes six pathovars of cruciferous plants. However, several authors have expressed doubts about the accuracy of certain of them (Alvarez *et al.*, 1994; Vauterin *et al.*, 1995; Vicente *et al.*, 2001, 2006, Fargier and Manceau, 2007). In a recent study (Fargier and Manceau, 2007), only three pathovars within *X. campestris* have been clearly associated to three distinct diseases: the black rot of cruciferous plant caused by *X. c. pv. campestris*, the leaf spot disease of Cruciferae and Solanaceae caused by *X. c. pv. raphani*, and the bacterial blight of cruciferous ornamental flowers caused by *X. c. pv. incanae* (McCulloch, 1929; White, 1930; Kendrick and Baker, 1942; Williams 1980; Fargier and Manceau, 2007). *X. c. pv. campestris* and *X. c. pv. incanae* are a vascular pathogen that invades the host through wounds, hydathodes

¹INRA ANGERS, UMR Pathologie Végétale, 42 rue Georges Morel, B.P. 60057, 49071 Beaucouzé Cedex, France

²GEVES la Minière, 78285 Guyancourt, France

(Shaw and Kado, 1987; William, 1980; Hugouvieux *et al.*, 1998, Kendrick and Baker, 1942). In contrast *X. campestris* pv. *raphani* enter into plants through stomata and cause infection of the parenchyma (McCulloch, 1929; White, 1930; Hugouvieux *et al.*, 1998). Infection of *X. c.* pv. *campestris* could also occur directly through stomata and caused pinpoint sized, water-soaking symptoms on seedlings prior to the development of black rot (Alvarez *et al.*, 1994). On the other hand, no variation in symptom expression has been reported for strains of *X. c.* pv. *raphani* (Alvarez *et al.*, 1994). As regard to their host range, *X. c.* pv. *raphani* have the widest host range, including Cruciferae and Solanaceae plants; it shares one part of its host range with *X. c.* pv. *campestris* and *X. c.* pv. *incanae*. By contrast *X. c.* pv. *campestris* and *X. c.* pv. *incanae* were strictly specific to their host. In addition to the host specificity scheme defined by pathovars, nine races were defined within *X. c.* pv. *campestris* (Fargier and Manceau 2007; Vicente *et al.*, 2001; Kamoun *et al.*, 1992) and three races were described within *X. c.* pv. *raphani* (Vicente *et al.*, 2006) according to their host range on a differential collection of cultivars of *Brassica* sp. and *Raphanus* sp. plants. These three pathogens are therefore ecologically distinct that is either to the type of interaction with their host or to their host range. It may be hypothesised that *X. campestris* pathovars evolved from the same ancestral population towards a better adaptation to their host sin outcompete to extinction each other because they acquired separately different modes to interact with their host plants. This hypothesis can be checked by multilocus sequence analysis (MLSA) (Gevers *et al.*, 2005) and a multilocus sequence typing (MLST) (Maiden *et al.*, 1998) performed on housekeeping genes. Since 1998, MLST has rapidly become the most popular molecular typing approach and was used to study the genetic structures of a large range of pathogenic or non pathogenic bacteria (Maiden, 2006). Housekeeping gene loci are chosen for analysis because they are ubiquitous and mutations within them are largely assumed to be selectively neutral. Therefore they are more likely to prop-

erly reflect the phylogeny of strains. Using multiple loci provides a buffer against the distorting effect of recombination at a single locus (Gevers *et al.*, 2005). The use of seven loci is currently admitted for valuable discrimination between strains and identification of clonal lineages (Maiden, 2006). One of the most powerful aspect of MLST analysis is its ability to detect and measure recombination. Since many years, bacteria are known to have several mechanisms to exchange genetic material (Lorenz and Wackernagel, 1994). Horizontal gene transfer by conjugation (Basim *et al.*, 1999) and phage transduction (Weiss *et al.*, 1994.) have been demonstrated to occur in nature. Recently, natural gene transfers have been reported (Comas *et al.*, 2006) to play an important role in the evolutionary history of *Xanthomonas* genomes. Therefore, evaluation of the recombination rate is very important to understand how bacterial strains evolve within species, how clones adapt to new environmental and host challenges, and thus how new pathogenic strains emerge.

Our objectives were to identify the genetic forces that drive evolution within *X. campestris* species and to analyse the genetic population structure of this species by MLSA-MLST in order to check if the genetic groups obtained are consistent with the pathovar subdivision. We provide the first MLST analysis of the plant pathogenic bacterium model of *Xanthomonas*. We find that pathovars of *X. campestris* form distinct but complex phylogenetic populations and that diversification sources were due to the evolutionary forces: recombination and mutation, promoting the coexistence of pathovars into this species.

This study also provides genomic data for developing valuable molecular techniques to identify pathogens and to improve detection methods in seed-health and plant health management.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Bacterial strains

The bacterial strains used in this study were obtained from the Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP) and from Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), Toulouse, France (Table 4.1). All strains were routinely cultured on YPGA (yeast extract 7g/L, peptone 7g/L, glucose 7g/L and agar 15g/L) or YPA (yeast extract 7g/L, peptone 7g/L and agar 15g/L) at 27°C. Cultures were stored in water at -20°C for short term conservation and frozen dry for long term conservation.

4.2.2 DNA isolation and sequencing

Bacterial strains were cultured in YPA at 27°C for 24 h, and bacterial suspensions (1×10^7 cfu/mL) were made in sterile distilled water. DNA extractions were performed according to the method described by Llop *et al.* (1999). Eight genes, seven housekeeping genes, *atpD* (ATP synthase beta chain); *dnaK* (heat shock protein 70, molecular chaperone DnaK); *efP* (elongation factor P); *glnA* (glutamine synthetase I); *gyrB* (DNA gyrase subunit B); *rpoR* (RNA polymerase sigma-70 factor) and *tpiA* (triosephosphate isomerase), and one gene coding for a transmembrane protein, *fyuA* (TonB-dependent receptor) were sequenced with the primers described in Table 4.2. These loci were chosen because they are uniformly spread on the chromosome of the published genome of *X. campestris* pv. *campestris* strain ATCC 33913 (Figure 4.1) (da Silva *et al.*, 2002).

All amplifications were carried out in a final volume of 20 μ l containing 1 X Colorless GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega), 200 μ M of each dNTP (Promega), 400 nM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 1 unit of GoTaq[®] Flexi DNA polymerase (Promega) and 50 ng of genomic DNA. The reactions were run for 35 cycles, each consisting of 50 s at 94°C, 50 s at appropriate anneal-

Chapitre 4. Étude de la diversité génétique de l'espèce *X. campestris*

Strain number ^a	Other collections	Race ^b	Host	Isolation ^c		Seq. Type
				Year	Country	
<i>X. c. pv. campestris</i>						
Xcc 147 ^d		4	<i>Brassica oleracea</i>			ST1
CFBP 5814	Clause 563apcs	9	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Spain	ST2
CFBP 6650	LMG 8004, NCPPB 1145	9	<i>B. oleracea</i>	1958	UK	ST3
CFBP 5241 ^T	LMG 568, ATCC 33913	3	<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	1957	UK	ST4
CFBP 5820	Clause 2963	8	<i>B. oleracea</i>			ST5
CFBP 5817	Clause 658pCS1	4	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2001	Chili	ST6
CFBP 5816	Clause 656C1FS1	1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Spain	ST7
CFBP 5818	Clause 751a2FS	1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2001	Spain	ST7
CFBP 3838	LMG 535, NCPPB 347	NP	<i>Iberis</i> sp.	1954	Tanzania	ST12
CFBP 1712		5	<i>B. oleracea</i> cv. <i>capitata</i>	1975	France	ST16
CFBP 1713		5	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1975	France	ST16
CFBP 5683		3	<i>B. oleracea</i>	1979	France	ST16
CFBP 1119		1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1967	France	ST17
CFBP 1869		1	<i>B. oleracea</i>	1976	Ivory Coast	ST17
CFBP 4952		1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>cortes</i>	1999	Belgium	ST17
CFBP 4953		7	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>cortes</i>	1999	Belgium	ST17
CFBP 5127	SNES 3316	1	<i>B. oleracea</i>	2000		ST17
CFBP 5128	SNES 3330	1	<i>B. oleracea</i>	2000		ST17
CFBP 5129	SNES 3429	1	<i>B. oleracea</i>	2000		ST17
CFBP 5130	SNES 3430	7	<i>B. oleracea</i>	2000		ST17
CFBP 5815	Clause 628a1cs	1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Spain	ST17
CFBP 4954		6	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>aviso</i>	1999	Belgium	ST18
CFBP 4956		4	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>spacestar</i>	1999	Belgium	ST19
CFBP 1124		8	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1967	France	ST20
CFBP 1710		8	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1975	France	ST20
CFBP 1711		8	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1975	France	ST20
CFBP 6863	NCPPB 875	8	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1958	Germany	ST20
CFBP 6865	NCPPB 2986	5	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1975	Australia	ST21
CFBP 1121		1	<i>B. oleracea</i> cv. <i>bullata gemmifera</i>	1967	France	ST22
CFBP 4955		9	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>aviso</i>	1999	Belgium	ST22
<i>X. c. pv. incanae</i>						
CFBP 1371		NP	<i>Matthiola incana</i>	1972	France	ST8
CFBP 1438	NCPPB 1934	NP	<i>Matthiola incana</i>	1949	USA	ST8
CFBP 2527 ^{pt}	LMG 7490, NCPPB 937	NP	<i>Matthiola incana</i>	1950	USA	ST8
CFBP 5686	Shmit J. 10903	NP	<i>Matthiola incana</i>	1981	France	ST8
CFBP 1606		NP	Ornamental crucifers	1974	France	ST10
<i>X. c. pv. raphani</i>						
CFBP 5828	LMG 7505	R3	<i>Raphanus sativus</i>		USA	ST13
CFBP 5829	LMG 8134	R3	<i>R. sativus</i>		USA	ST14
CFBP 5827 ^{pt}	LMG 860, NCPPB 1946	R3	<i>R. sativus</i>	1940	USA	ST15
756C ^d	Kamdar <i>et al.</i> , 1993	R3	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (seed)		E. Asia	ST23
<i>X. campestris</i>						
CFBP 5825	LMG 547, NCPPB 983	NP	<i>Barbarea vulgaris</i>	1939	USA	ST9
CFBP 5826	LMG 7385	NP	<i>B. vulgaris</i>	1939	USA	ST9
CFBP 5824	LMG 7383, NCPPB 1930	NP	<i>Armoracia lapathifolia</i>	1939	USA	ST11

^a pt, pathotype strain; T, type strain.

^b NP, non pathogenic on differential cultivars; R for race of *X. c. pv. raphani*.

^c Year of isolation and country of origin given where known.

^d Bacterial strains provided by LIPM, Toulouse, France.

Table 4.1: *Xanthomonas campestris* strains used in this study and their sequence type

4.2 Materials and methods

Target gene	PCR Primer ^a			Sequencing Primer	
	Name	Ta (°C)	Sequence (5S-3S)	Name	Sequence (5S-3S)
<i>atpD</i>	P-X-ATPD-F ^b	60	GGGCAAGATCGTTCAGAT	emiatpD1F	TTCAGATCATCGGCGCGGT
	P-X-ATPD-R ^b		GCTCTTGGTCGAGGTGAT	emiatpD2R	TTGGTCGAGGTGATGCGCT
<i>dnaK</i>	P-X-DNAK-F ^b	62	GGTATTGACCTCGGCACCAC	emidnaK1F	ACCAAGGACGGCGAAGTGCT
	P-X-DNAK-R ^b		ACCTTCGGCATAACGGGTCT	emidnaK2R	CGATCGACTTCTTGACCAGG
<i>efp</i>	P-X-EFP-F ^b	62	TCATCACCGAGACCGAATA	emiefp1F	TCACCGAGACCGAATACG
	P-X-EFP-R ^b		TCCTGGTTGACGAACAGC	P-X-EFP-R ^b	TCCTGGTTGACGAACAGC
<i>glnA</i>	P-X-GLNA-F ^b	62	ATCAAGGACAACAAGGTGC	emighnA1F	GCTGATCAAGGACAACAAGG
	P-X-GLNA-R ^b		GCGGTGAAGGTCAGGTAG	emighnA3R	ACTTCATCGTCAAGCAGTTCG
<i>gyrB</i>	emigyrB1F	60	TGCGCGGCAAGATCCTCAAC	emigyrB2F	CGCTACCACCGCATCATCCT
	emigyrB4R		GCGTTGTCTCGATGAAGTC	emigyrB3R	AGGTGCTGAAGATCTGGTTCG
<i>rpoR</i>	emirpo11F	62	ATGGCCAACGAACGTCCTGC	emirpo27F	GAAATCGCCATCGCCAAGC
	emirpo13R		AACTTGTAACCGCGACGGTATTCG	emirpo12R	CGGTTGGTGTACTTCTTGG
<i>fyuA</i>	emifyuA3F	62	ACCATCGACATGGACTGGACC	emifyuA5F	ACGGCACGCCGTTCTGGGG
	emifyuA4R		GTCGCCGAACAGGTTACCC	emifyuA6R	GATCAGGTTACGCCGAACCT
<i>tpiA</i>	emitpiA1F	57	GGAAATTGGAAGCTGCATGG	emitpiA2F	CTTCGCCACCGAACTGG
	emitpiA6R		GAARTCTTCGGCRACCAGT	emitpiA5R	TCTTCGGCRACCAGTGA

^a R,reverse primer; F, forward primer.

^b according to Boudon *et al.*, 2005.

Table 4.2: Primers used for PCR amplification and sequencing of *X. campestris* strains type

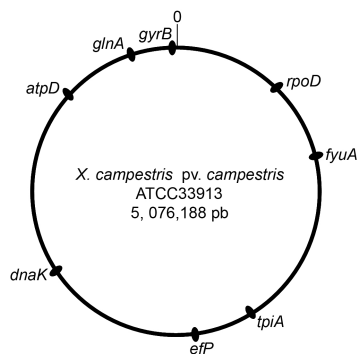


Figure 4.1: Relative location of the seven housekeeping genes and the *fyuA* gene used in this study on a schematic chromosomal map of *X. c. pv. campestris* strain ATCC 33913: *atpD* (XCC0554); *dnaK* (XCC1474); *efp* (XCC2272); *glnA* (XCC0185); *gyrB* (XCC0004); *rpoR* (XCC3736); *tpiA* (XCC2531) and *fyuA* (XCC3358).

ing temperature (Table 4.2) and 1 min at 72°C, with initial denaturation for 3 min at 94°C and final extension for 7 min at 72°C. Amplification products were separated on a 1.5% agarose gel in TBE, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light on a GelDoc 2000 (Bio-Rad, France). PCR amplicons were sent to Ouest Genopole sequencing platform (Roscoff, France) where DNA purification and DNA sequencing were performed using primers defined in Table 4.2. Only sequences obtained on both strands (approximately 550 bp in average) were used for analyses.

4.2.3 Phylogenetic analysis

Sequence electrophoregrams were analysed with Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). DNA sequences were aligned with Multalin (Corpet, 1988 <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) and converted into MEGA and NEXUS files with START (Sequence Type Analysis and

Recombinational Tests) (Jolley *et al.* 2001. <http://www.mlst.net>). The identical alleles were identified with SNAP Map of SNAP Workbench (Price and Carbone. 2005) (Aylor *et al.*, 2006) which is a command line-based tool that collapses DNA sequence data into unique haplotypes, extracts variable sites, and manipulates output into multiple formats for input into existing software packages for evolutionary analyses. Sequence analysis was carried out on multiple alignments by determining pairwise nucleotide diversity π (the average number of nucleotide differences per site between two sequences) and Watterson θ_w (estimate of the population mutation rate) using DnaSP, version 4.0 (Rozas *et al.*, 2003).

Two tests of selection were performed: Tajima's D (Tajima, 1989) using DnaSP, version 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) and the Nei and Gojobori (1986) method of estimating synonymous substitutions (d_N/d_S ratio) using START2 package (<http://www.mlst.net>) (Jolley *et al.*, 2001).

Phylogenetic analyses were performed on individual gene sequences as well as on the concatenated data set. Modeltest (Posada and Crandall, 1998) was used to determine the optimal nucleotide substitution model for each gene. The model GTR was determined to be the optimal likelihood model for all loci. Neighbor-joining (NJ) trees were generated with the Neighbor program from PHYLIP (Felsenstein, 2005) by using the jukes-Cantor distances methods and 1000 bootstrap replicates for all sequences. Maximum-likelihood (ML) trees were generated with PhyML Online, (Guindon and Gascuel, 2003) (Guindon *et al.*, 2005), using the optimal Modeltest parameters and a starting NJ tree with 500 bootstrap replicates for all sequences. The resulting phylogenetic trees were visualized in A Tree Viewer (ATV) (Zmasek and Eddy, 2001 <http://www.genetics.wustl.edu/eddy/atv/>). Split decomposition analyses were performed with SplitsTree4 V4.3 (Huson and Bryant, 2006; <http://www.splitstree.org/>) by using hamming (uncorrected) distance and 1000 bootstrap replicates. The split decomposition is a parsimony method that permits a tree-like network structure if conflicting phy-

logeny signals are detected in the data set (Huson, 1998). Intragenic recombination was estimated by split decomposition of individual genes, the total recombination (inter- and intragenic) was estimated by using the concatenated data set. Phylogenetic congruence between ML trees was tested by using Shimodara-Hasegawa (SH) test (Shimodaira and Hasegawa, 1999). This test informs on the evolutionary history of loci by determining the likelihood of a data set given alternative trees. SH test is significant when evolutionary histories are identical and is rejected when there are events of homoplasie that may be due to recombination events. The SH test was performed via the DNAML program from PHYLIP (Felsenstein, 2005) with no branch length.

Three recombination analyses were performed with START and START2 (<http://www.mlst.net>) (Jolley *et al.*, 2001). Mosaic structures resulting from recombination events were detected by the maximum chi-squared test ($P < 0.001$) (Maynard-Smith, 1992). Putative recombination break points were identified and permuted data sets were used to test the significance. The index of association (*IA*) (Maynard-Smith *et al.*, 1993) was estimated to measure the degree of clonality within data sets, for all strains and the 23 sequence types (ST) as described in the paragraph below. The third analysis was the Homoplasie Test (Maynard-Smith and Smith, 1998) which aims to measure the importance of recombination between members of a population.

4.2.4 MLST analysis

For each locus, the sequence obtained for the 42 isolates were compared, and an allele number was arbitrary assigned to each different sequences. For each isolate, we defined an allelic profile corresponding to the combination of alleles obtained at each locus. Each unique allelic profile is referred as a sequence type (ST). STs were grouped into clonal complexes using eBURST V3 (Feil *et al.*, 2004; <http://eburst.mlst.net/>). A clonal complex contains strains that have closer allelic profiles including single locus variants (SLVs), i.e. strains that differ from the consensus group at a single locus, double

4.3 Results

locus variants (DLVs), i.e. strains that differ at two loci, and satellites, i.e. strains that differ at three or more loci. The program identified the putative ancestral genotype, that is the ST which has the most single-locus variants. We estimated the recombination rate by using the method described by Feil *et al.*, (2000).

The sequences of the alleles that differ between each ancestral ST and its associated SLVs were compared and were assigned as resulting from either a recombinational replacement or a point mutation. If an allele arises by a point mutation then it differs from the ancestral allele at a single nucleotide site; de novo point mutation will result in an allele that is very likely to be unique within the data set. Those that differ at multiple nucleotide sites, and these that differ at a single nucleotide but which occur several time in the data set, are assigned as arisen by recombination. The role of recombination relative to the role of mutation in creating diversity was measured by determining the ratio of recombination to point mutation (r/m ratio) per allele and per nucleotide.

4.3 Results

4.3.1 Phylogenetic analyses

Sequences analyses

DNA fragments of seven housekeeping genes and one structure gene were sequenced for forty one strains including the two sequenced strain CFBP 5241 (ATCC 33913) and CFBP6650 (LMG 8004) (Table 4.1). The forty second strain included in this analysis was the strain 756C named *X. c.* pv. *armoraciae* by Kamdar *et al.*, (1993) and identified as *X. c.* pv. *raphani* (Fargier and Manceau, 2007). The eight DNA fragments of interest of this strain were obtained from the Comprehensive Microbial Resource (CMR) (<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=Xca>) by blast-

Chapitre 4. Étude de la diversité génétique de l'espèce *X. campestris*

Locus	Function	Fragment size (bp)	# of alleles	# of polymorphic sites	% of variable sites	π	θ_w	Amino acid sequence variants	D^a	d_N	d_S	d_N/d_S
<i>atpD</i>	ATP synthase β chain	512	14	21	4,1	0,00962	0,00953	3	0,03139	0,0007	0,0455	0,0164
<i>dnaK</i>	heat shock protein 70	540	10	24	4,4	0,00658	0,01033	3	-1,216	0,0016	0,0564	0,0291
<i>efP</i>	elongation factor P	434	7	8	1,8	0,0039	0,00428	2	-0,25361	0,0009	0,0301	0,0287
<i>fyuA</i>	TonB-dependent receptor	669	15	26	3,9	0,00907	0,00903	3	-0,11062	0,0008	0,0462	0,0165
<i>glnA</i>	glutamine synthetase	582	11	17	2,9	0,0071	0,00679	2	-0,03842	0,0004	0,0432	0,0095
<i>gyrB</i>	gyrase subunit β	521	6	18	3,5	0,00597	0,00803	2	-0,83241	0,0009	0,0571	0,0154
<i>rpoR</i>	RNA polymerase sigma-70 factor	697	13	71	10,2	0,03159	0,02367	8	0,88846	0,0126	0,119	0,1062
<i>tpiA</i>	triosephosphate isomerase	565	12	26	4,6	0,01112	0,01069	8	-0,11616	0,0044	0,0446	0,0982

^a Not significant, $P > 0,10$

π , Pi, Nucleotide diversity, the average number of nucleotide differences per site between two sequences.

θ_w , Watterson theta estimates the population mutation rate.

#, for number

Table 4.3: Sequence variation at the eight loci

ing our sequences with the CMR-BLASTn program. All strains produced one single amplicon of the expected size for each gene. The forty two sequences of each locus were aligned; no gap and no insertion in the sequences of all strains of *X. campestris* were detected. The size of the eight alignments ranged from 434 bp to 697 bp (Table 4.3). All loci were polymorphic and the number of polymorphic nucleotide sites varied from 71 (i.e. 10.2 %) for the most polymorphic locus (*rpoR*) to 8 (i.e. 1.8%) for the less polymorphic locus (*efP*) (Table 4.3). The proportion of variable sites was around 4% in the other loci. Alleles were defined as distinct if they differed at a single nucleotide site and were numbered consecutively for identification. The number of alleles at each locus ranged from 6 for *gyrB* to 15 for *fyuA*. The overall mean value was 11 alleles per locus within *X. campestris*.

The pairwise nucleotide diversity (π) and Watterson's theta (θ_w) were consistent across loci (Table 4.3) except for the least and the most polymorphic genes *efP* and *rpoR* respectively. The π value was ranged from 0,00597 (*gyrB*) to 0,01112 (*tpiA*) for the six other loci and the θ_w value was ranged from 0,00679 (*glnA*) to 0,01069 (*tpiA*).

Selection

Genes from core genome are currently used in MLST schemes because they encode essential metabolic functions, they are shared by all members of the species, and they are less likely to be horizontally transferred among strains. Therefore, most of the non-synonymous changes occurring at these loci would be expected to be eliminated by a purifying selection. We tested for evidence of selection at each locus using Tajima's D statistic (Tajima, 1989) and the Nei and Gojobori (1986) method of estimating synonymous substitutions (d_N/d_S ratio). Tajima's D tests the hypothesis that all mutations are selectively neutral (Kimura, 1983) and measures the differences between the population mutation rates and the average number of nucleotide differences. Under neutrality, the means of θ_w and π should be equal to one another. The expected value of Tajima's D for population conforming to standard neutral model is zero. This test did not produce any statistically significant values (Table 4.3), which means that mutations are selectively neutral. The d_N/d_S test (Nei and Gojobori, 1986) measures the ratio of the non-synonymous d_N to the synonymous d_S substitution rates and informs about the evolutionary forces operating on a particular gene. Under neutrality, the expected value of d_N/d_S ratio is 1, for positively selected genes the expected value of d_N/d_S is superior to 1 and under purifying selection the expected value of d_N/d_S is inferior to 1. The low d_N/d_S ratios measured at the eight loci (0.0095 to 0.1062) indicate that there is a selection against amino acid changes in these genes. As expected, since changes at third codon position were mostly silent, we observed that a high majority of mutation occurred at the third codon position. In *atpD* gene 86% of mutations were at the third codon position, 92% for *dnaK*, 100% for *efp*, 88% for *fyuA*, 94% for *gyrB*, 89% for *glnA*, 75% for *rpoR*, and 77% for *tpiA*.

ML, NJ, Split decomposition, congruence

Phylogenetics trees were constructed by Maximum parsimony (MP), Neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood methods (ML) using individual gene sequences as well concatenated data set. The trees were unrooted but we included in our analyses three strains of *Xanthomonas* that belong to other species: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (NC_007508) (Thieme *et al.*, 2005), *X. axonopodis* pv. *citri* (NC_003919) (da Silva *et al.*, 2002) and *X. oryzae* pv. *oryzae* (NC_006834) (Lee *et al.*, 2005). All phylogenetic methods produced similar trees for the concatenated data set and we have chosen to present the NJ tree to display the *X. campestris* phylogeny history (Figure 4.2). *X. campestris* formed a monophyletic group clearly different from the three other *Xanthomonas* species. The 23 genotypes within the *X. campestris* can be separated into several clusters. Strains of *X. c.* pv. *campestris* grouped in two clusters (Xcc 1, Xcc 2) whereas *X. c.* pv. *raphani* and *X. c.* pv. *incanae* strains did not fit in pathovar clusters. Xcc 1 and Xcc 2 clusters were supported by high bootstrap value. Xcc 1 contained 21 *X. c.* pv. *campestris* isolated from *Brassica oleracea* and one from *Iberis* sp. (CFBP 3838, ST 12). Xcc 2 contained 8 strains of *X. c.* pv. *campestris* isolated from *Brassica oleracea* only.

Strains of *X. c.* pv. *raphani* were more polymorphic, the branches in the tree were longer than for those of other *X. campestris* strains that indicates a larger genetic diversity within *X. c.* pv. *raphani* than in *X. c.* pv. *campestris*. *X. c.* pv. *incanae* strains grouped with non pathogenic strains (*X. campestris*) and with the strain CFBP 5814 (ST2) with a significant bootstrap value. This last strain was identified as *X. c.* pv. *campestris* because it caused symptoms of black rot after artificial inoculation on *Brassica oleracea* (Fargier and Manceau, 2007). However, the strain was weakly pathogenic. The subset of 42 *X. campestris* strains were analysed by split decomposition method, a software able to display conflicting phylogenies contained in the data set. When the descent is clonal, split decomposition constructs a

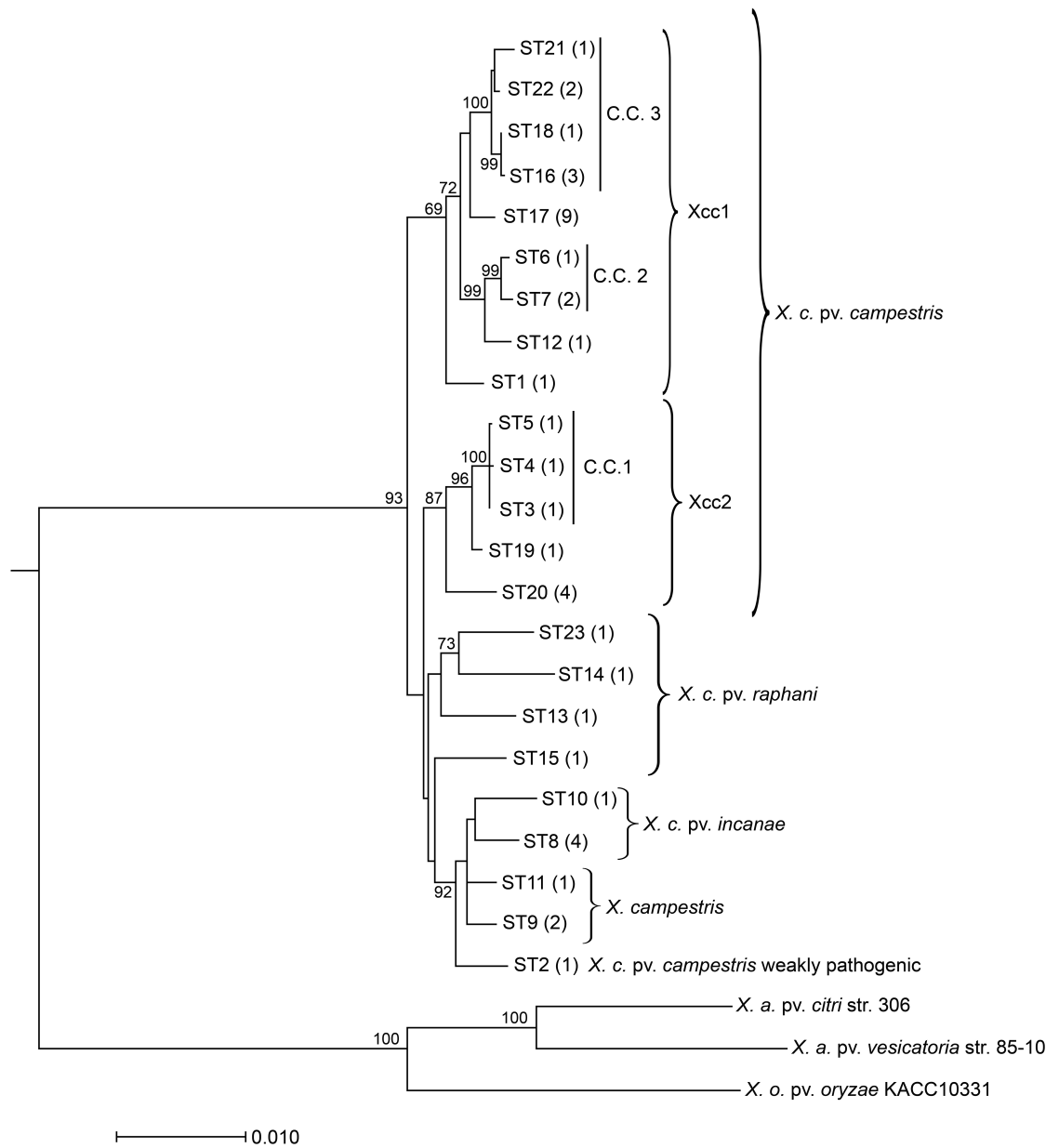


Figure 4.2: NJ tree of the concatenated data set. The number of strains grouped in each sequence type (ST) is displayed in brackets. The bootstrap scores greater than 60 are displayed at each node. Strains of *X. c. pv. campestris* are distributed into two groups (Xcc1 and Xcc2) with significant bootstrap scores. Clonal complexes (CC1, CC2 and CC3) are represented by a line. See Table 4.1 for strains designations and ST correspondence.

tree like-structure, but when the evolutionary history of the population is biased by recombination or homoplasy, a network structure is created. This analysis was done at the eight individual loci as well as on the concatenated data set. Splitstree graphs of *dnaK*, *efP*, *gyrB*, *rpoR* and *tpiA* sequence data revealed parallelograms that indicated the presence of homoplasy or of few events of recombination within this species (Figure 4.3). When concatenated data were used, a tree like-structure with only one parallelogram between *X. c. pv. raphani* strains where observed (Figure 4.4). Groups with high bootstrap values defined by the NJ phylogenetic analysis were recovered in the splitstree graph of the concatenated data. The information gave by the concatenated data smoothed the genetic structure of the *X. campestris* species indicating that the small number of recombination events did not bias the genetic structure of the population.

Shimodaira-Hasegawa test

We performed a Shimodaira-Hasegawa (SH) test (Shimodaira and Hasegawa, 1999) to determine if the eight loci had the same evolutionary history. The SH test is significant only when evolutionary histories are identical and is rejected when there is a small amount of recombination. Data of some genes were found to be significantly incongruent with the trees of other loci and with concatenated data except their own (Table 4.4). Only *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* and *rpoR* data set were congruent with the NJ tree generated with the concatenated data set. In case of strictly clonal population we expected that the evolutionary histories of these loci were the same. The significant incongruence measured between loci suggests that recombination events have occurred in this population.

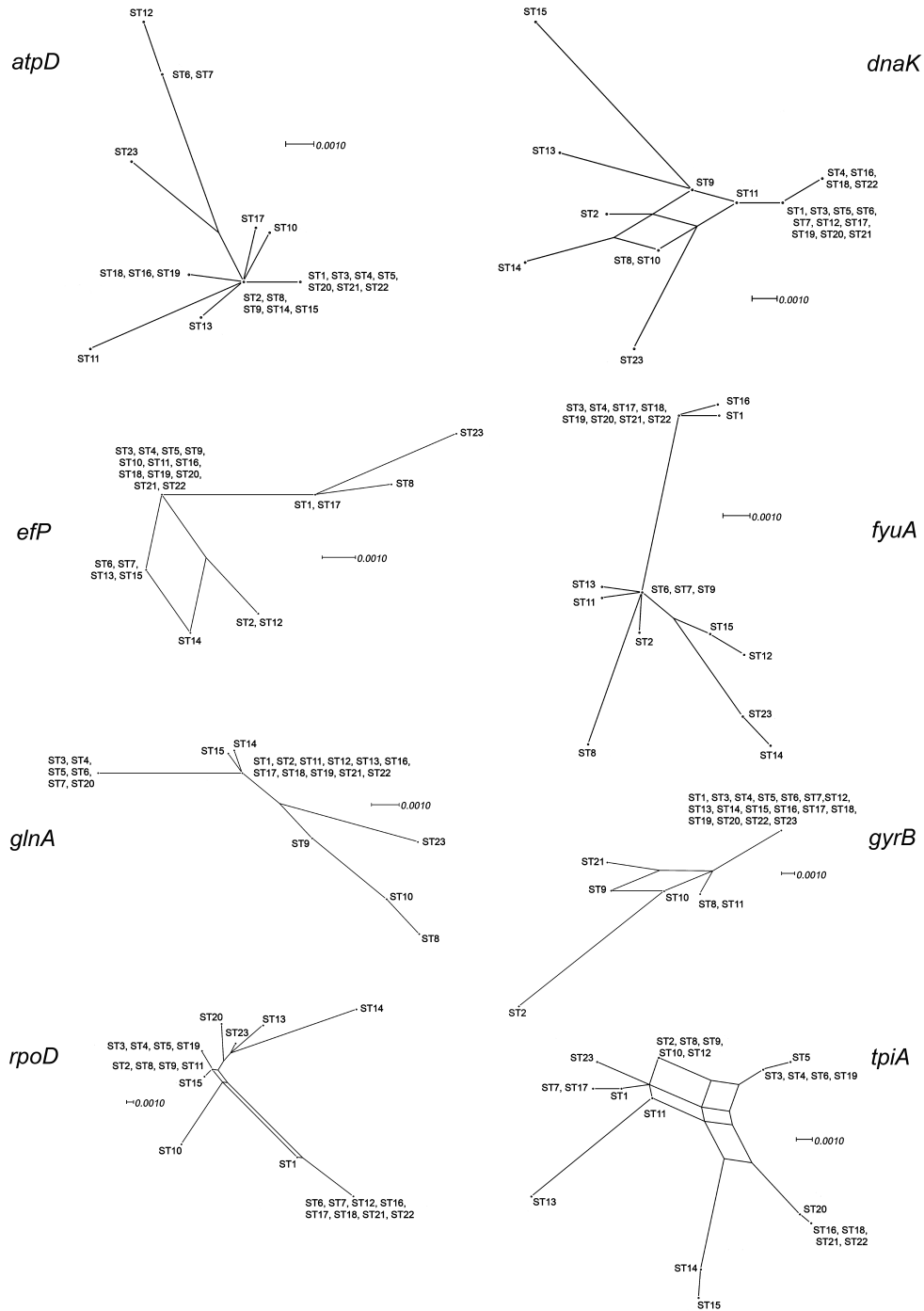


Figure 4.3: Splitstree graphs of multilocus sequence analysis of the 23 *X. campestris* strains representative of each sequence type (ST) for the eight loci. The designation at the branches indicates the ST number. See Table 4.1 for strains designations and ST correspondence.

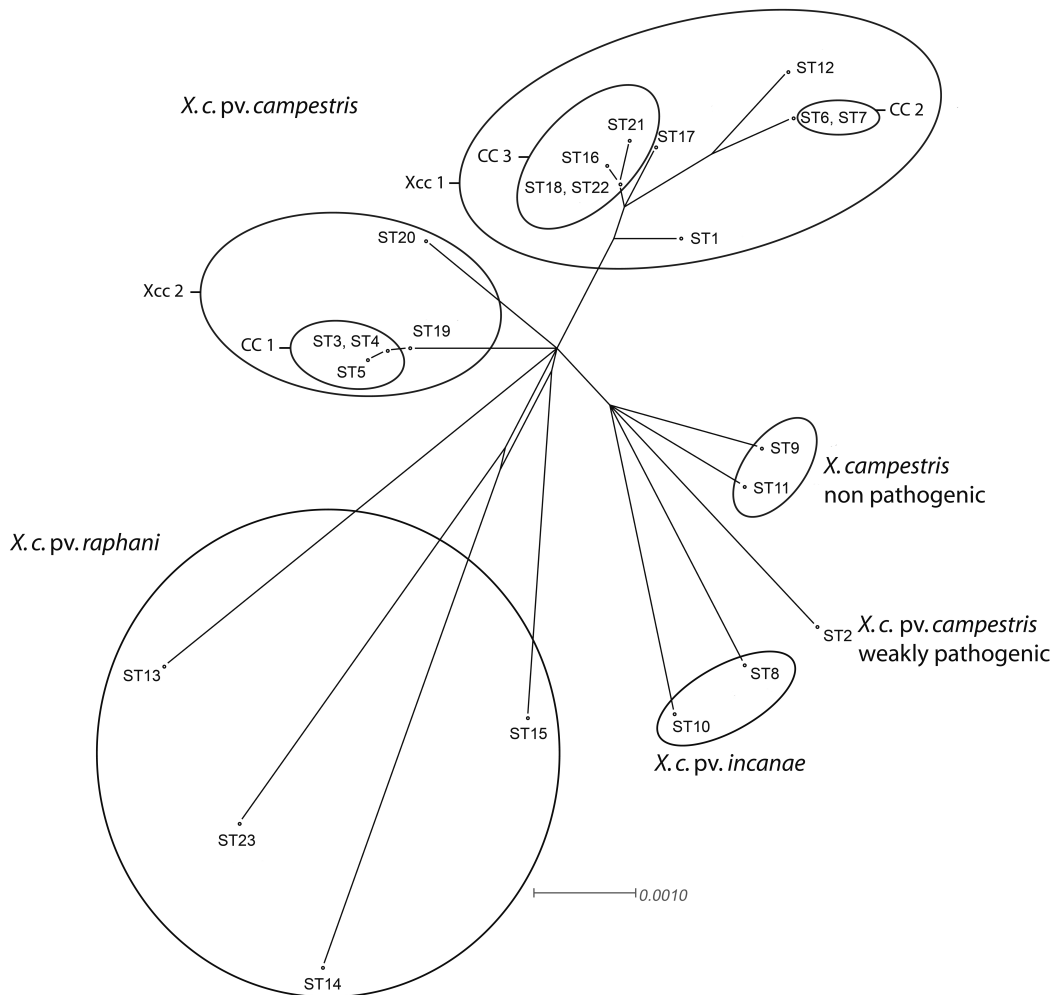


Figure 4.4: Split decomposition analysis of the concatenated data set for the 23 *X. campestris* strains representative of each sequence type (ST). The designation at the branches indicates the ST number. See Table 4.1 for strains designations and ST correspondence. Pathovars are indicated on the figure. Xcc1 and Xcc2 indicate groups evidenced by NJ analysis. CC1, CC2 and CC3 indicate clonal complexes made by eBurst analysis.

4.3 Results

Tree	P^a								Concatenated
	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>efP</i>	<i>fyuA</i>	<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoR</i>	<i>tpiA</i>	
<i>atpD</i>		0.000	0.029	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>dnaK</i>	0.000		0.013	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>efP</i>	0.000	0.002		0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>fyuA</i>	0.000	0.003	0.015		0.037	0.003	0.000	0.000	0.000
<i>glnA</i>	0.000	0.059	0.039	0.000		0.003	0.000	0.000	0.000
<i>gyrB</i>	0.000	0.001	0.016	0.000	0.001		0.000	0.000	0.000
<i>rpoR</i>	0.000	0.009	0.016	0.000	0.001	0.004		0.000	0.135
<i>tpiA</i>	0.000	0.001	0.019	0.000	0.000	0.004	0.000		0.000
Concatenated ML	0.025	0.130	0.014	0.008	0.002	0.156	0.414	0.000	
Concatenated NJ	0.019	0.145	0.013	0.102	0.040	0.168	0.468	0.000	0.869

^a P value, significant differences are boldfaced.

Table 4.4: Shimodaira-Hasegawa Test for phylogenetic congruence

4.3.2 MLST analyses

Twenty three sequence types (ST) were obtained. Sixteen of these STs were represented by only one single isolate. The largest ST was ST 17 that grouped nine strains, ST 8 and ST 20 contained four strains each, ST 16 three strains and ST 7, ST 9 and ST 22 grouped two strains each (Table 4.1 and Table 4.5). Clonal complexes (CC) were determined as STs that contained at least 6 alleles in common out of the 8 loci using eBURST V3 (Feil *et al.*, 2004 ; Spratt *et al.*, 2004). Three clonal complexes (CC) and 14 singletons were identified (Table 4.5). The three clonal complexes were identified within *X. c. pv. campestris*. The CC 1 was composed of 3 STs (ST 3, ST 4, and ST 5) containing one strain each; the program identified the ST 3 as the ancestral sequence type of the CC 1. Three strains which grouped in ST 6 (CFBP 5817) and ST 7 (CFBP 5816 and CFBP 5818) formed the CC 2. The CC 3, grouped four STs containing 7 strains, ST 16 (CFBP 1712, CFBP 1713 and CFBP 5683), ST 18 (CFBP 4954), ST 21 (CFBP 6865) and ST22 (CFBP 1121 and CFBP 4955). ST 18 was identified as the ancestral sequence type in CC 3. In the NJ tree (Figure 4.2) the CC 2 and the CC 3 are close to each other but when allele composition is considered they have only one allele in common; at the opposite CC3 and CC1 shared 3 to 4 for alleles (Table 4.5).

Six STs of *X. c. pv. campestris* were not included in the three clonal complexes. One of these singletons (ST 2, strain CFBP 5814) had a very

Chapitre 4. Étude de la diversité génétique de l'espèce *X. campestris*

Groups of isolates and sequence type (ST)	Allelic Profiles							
	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>efP</i>	<i>fyuA</i>	<i>glnA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoR</i>	<i>tpia</i>
<i>CC1^a</i>								
<i>X. c. pv. campestris</i>								
(ST 3)*	4	1	6	3	10	1	4	9
(ST 4)	4	9	6	3	10	1	4	9
(ST 5)	4	1	6	3	10	1	4	10
<i>CC2</i>								
<i>X. c. pv. campestris</i>								
(ST 6)	7	1	4	4	10	1	12	9
(ST 7)	7	1	4	4	10	1	12	11
<i>CC3</i>								
<i>X. c. pv. campestris</i>								
(ST 16)	2	9	6	13	1	1	11	8
(ST 18)*	2	9	6	14	1	1	11	8
(ST 21)	4	1	6	14	1	3	11	8
(ST 22)	4	9	6	14	1	1	11	8
Singletons								
<i>X. c. pv. campestris</i>								
(ST 1)	1	1	1	1	1	1	1	1
(ST 2)	13	3	3	2	2	6	7	5
(ST 12)	6	1	3	10	1	1	12	5
(ST 17)	11	1	1	14	1	1	11	11
(ST 19)	2	1	6	14	1	1	4	9
(ST 20)	4	1	6	14	10	1	9	7
<i>X. c. pv. raphani</i>								
(ST 13)	3	5	4	11	3	1	6	2
(ST 14)	13	4	2	7	5	1	10	3
(ST 15)	12	2	4	12	4	1	5	4
(ST 23)	14	10	7	15	11	1	13	12
<i>X. c. pv. incanae</i>								
(ST 8)	10	8	5	5	6	2	3	5
(ST 10)	5	8	6	8	9	5	2	5
<i>X. campestris</i>								
(ST 9)	9	6	6	6	8	4	8	5
(ST 11)	8	7	6	9	7	2	8	6

^a CC: clonal complex; * Ancestral sequence type in the clonal complex.
A clonal complex groups sequence types (STs) that contain at least 6 alleles in common out of eight.

Table 4.5: Allelic profiles of 42 *X. campestris* strains

4.3 Results

different allelic profile compared to the others *X. c. pv. campestris* with 5 private alleles out of 8. This strain shared allele *atpD* 13 with one strain of *X. c. pv. raphani* ST 14 (CFBP 5829) and allele *tpiA* 5 with the five strains of *X. c. pv. incanae* (ST 6 and ST 8), the two strains isolated from *Barbarea vulgaris* (ST 9) and one strain isolated from *Iberis* (ST 12). In the NJ tree strain CFBP 5814 is closer to *X. c. pv. incanae* and *X. campestris* than the other *X. c. pv. campestris*. This strain was non pathogenic on many cruciferous plants and the symptoms observed on susceptible host were very light (Fargier and Manceau, 2007).

The strain CFBP 3838 (ST 12), isolated from *Iberis*, is the pathotype strain of *X. c. pv. armoraciae*. It was reclassified as *X. c. pv. campestris* after pathogenicity characterizations (Fargier and Manceau, 2007). This strain contained 2 unique alleles (*atpD* 6 and *fuyA* 10), shared 4 alleles (including *rpoR* 12 which is present only in strains of CC2) with the strains of *X. c. pv. campestris* and had 2 alleles in common with strain CFBP 5814 (ST 2). Furthermore it grouped with CC 2 in the NJ tree with a high bootstrap value (Figure 4.2).

The four last singletons of *X. c. pv. campestris* (ST 1, ST 17, ST 19 and ST 20) shared at least 6 alleles with the pool of alleles of all *X. c. pv. campestris*, but not enough alleles in common with each clonal complex to be grouped in one of them. Nevertheless, the NJ phylogenetic reconstruction method and the splitstree decomposition analysis allowed grouping of these STs with certain identified clonal complexes with significant bootstrap values (Figure 4.2).

Within *X. c. pv. raphani* pathovar, the four STs identified were characterized by a very high level of genetic divergence with 6 to 7 private alleles out of 8 for each ST. However, they all shared the allele *gyrB* 1 that is in common with 28 of the 30 strains of *X. c. pv. campestris*. Within *X. c. pv. incanae* pathovar four out of five strains of were genetically identical (ST 8); they correspond to the four strains isolated from *Matthiola incana*. Their

ST 8 shared the allele *tpiA* 5 with the two strains of *X. campestris* CFBP 5825 and CFBP 5826 (ST 9) isolated from *Barbarea vulgaris* and with two strains of *X. c. pv. campestris*, CFBP 5814 (ST 2) isolated from *Brassica oleracea* and CFBP 3838 (ST 12) isolated from *Iberis*. The fifth strain of *X. c. pv. incanae*, strain CFBP 1606 isolated from an ornamental crucifer, felt in ST 10 that shared only two alleles (*dnaK* 8 and *tpiA* 5) with the other strains of *X. c. pv. incanae*, and the allele *efP* 6 with some strains of *X. c. pv. campestris* (ST 3, ST 4, ST 5, ST 16, ST 18, ST 19, ST 20, ST 21 and ST 22) and strains of *X. campestris* (ST 9 and ST 11). Even if these five *X. c. pv. incanae* strains shared only two alleles, their sequences were close to each other and they clustered together in the NJ tree (Figure 4.2).

The three strains that were found avirulent on all cruciferous plants tested (Fargier and Manceau, 2007) were grouped into two STs (ST 9 and ST 11). The two strains grouped into the ST 9 were isolated from *Barbarea vulgaris*; their allelic profile contained five unique alleles and one allele (*rpoR* 8) in common with the strain CFBP 5824 (ST 11). This last strain, isolated from *Armoracia rusticana*, exhibited five unique alleles, as well.

4.3.3 Assessment of recombination rate within *X. campestris* species

Mutation and recombination are the two genetic events which lead to accumulation of stable diversity within bacterial genomes. Generally, the sequence diversity within a clonal population is the result of a slowly random accumulation of point mutation. But this diversity can be increased by intragenic or intergenic recombination.

linkage disequilibrium

We performed an *IA* test (Maynard-Smith *et al.*, 1993) to measure the extent of linkage equilibrium within this population because frequent recombinations

induce a linkage equilibrium. The program is implemented in START 2 (Jolley *et al.*, 2001; <http://www.mlst.net>). An *IA* significantly different from zero indicates a clonal population with no recombination between alleles. Different sets of strains were successively analyzed for linkage equilibrium. The value of *IA* for the 42 strains of *X. campestris* was equal to 2.4389 ($P = 0.000$), for the 23 STs representative of *X. campestris* the *IA* was equal to 1.2781 ($P = 0.000$), for the 30 strains of *X. c. pv. campestris*, the *IA* was equal to 2.1501 ($P = 0.000$) and finally for the 15 STs representative of *X. c. pv. campestris* only, *IA* was equal to 1.2731 ($P = 0.003$). *IA* values were significantly different from zero in all cases indicating that the population structure was clonal and consequently, the intergenic recombination was rare.

Recombination Ratio r/m

In order to estimate the contribution to sequence diversity by recombination or by mutation we measured the ratio r/m according to Feil *et al.*, 1999 method. They suggest that, because we look at short period of time, “the likelihood that a single variant allele represents multiple independent events is low”. Because a single nucleotide variant may be attributed to a point mutation or to one recombination event, they reason that “a point mutation is very likely to generate a novel allele” and will be attributed to recombination if this variant allele was found elsewhere in the population. We identified five SLVs in the three clonal complexes. Two of these 5 SLVs were attributed to a recombination event because they differed by more than 1 nucleotide substitution, the 3 other SLVs, differed by a single nucleotide substitution but 1 of these 3 SLVs was attributed to a recombination event because this variant allele was found elsewhere in other STs (*dnaK* 1 and *dnaK* 9) (Table 4.5). Then, we estimated this ratio (r/m) at 3:2, suggesting that one locus is 1.5 times more likely to diversify by a recombination event than by a point mutation in this population. At the nucleotide level, this ratio was 13:2 indicating that a nucleotide is 6.5 times more likely to change by recombination

than by mutation. These two ratios suggest that the recombination plays a role in the diversification of the population but not much stronger than mutation. Equilibrium may exist between these two sources of polymorphism in this population.

Chi-squared

Visual examination of the sequences can provide evidence of recombination by the observation of mosaic genes. The sequence of allele *rpoR* 1 between the site 1 and the site 294 differs from allele *rpoR* 4 at 26/294 sites ($\simeq 8.84\%$) but only at 0/403 remaining sites ($< 0.2\%$) (Figure 4.5). The region 1-175 of allele *rpoR* 2 differs from alleles *rpoR* 3, *rpoR* 5, *rpoR* 7 and *rpoR* 8 between 15 and 16/175 sites ($\simeq 9\%$) respectively, but only at 1 or 0/522 at remaining sites ($\simeq 0.2\%$) (Figure 4.5). Similarly, the region 1-541 of allele *rpoR* 10 differs from alleles *rpoR* 6 and *rpoR* 13 between 8 and 6/541 sites ($\simeq 1.3\%$) only, respectively, but at 17 and 16/157 remaining sites ($\simeq 10.5\%$) (Figure 4.5). These putative recombination break points can be detected statistically among pairwise comparisons of alleles of each locus using the maximum chi-squared test ($P < 0.005$) (Maynard-Smith, 1992). We performed this test implemented into START V2 (Jolley *et al.*, 2001; <http://www.mlst.net>) for all genes with all pairwise combinations of alleles. It failed to find any significant recombination break point for all genes excepted within *rpoR* gene.

Homoplasy Test

The importance of recombination between members of a population was estimated by using the Homoplasy Test (Maynard-Smith and Smith, 1998). This test determines if an excess of homoplasy exists in a phylogenetic tree due to recombination events in comparison with the number of homoplasy expected by mutation in a strictly clonal population. A clonal population has a homoplasy ratio near zero; at the opposite, freely recombinant population has an homoplasy ratio near to one. The significance of this value is

4.3 Results

```

Position          1111111111111111111111222222222222233333333444444455555555555666666666666
12457778899001223333456780235566788892235788013467145677889990000122355
32080392514692170689249548987849178942819412380292410912565781579624758

Site Number       1111111111222222222233333333333334444444444555555555666666666677
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901

Consensus        CCCCTCAGCTGCCTCCCCCTGAGTGGGCTTCAATTCCAGTGCCGGGTGAGCGCTGTGTGAGGAGGGGCT
Site Type        vtttttt-tttv--tvttvvttttt-vttttvtvvttttvttvtvtvtvvttvvv-vvttvvtvvvttt
Character Type   -i-i--i-i--iiii-iiii-i-iiiiiiiiiiiiiiii-iiiiiiiiiiiiii---i-----i-i-iiii
rpoD11          (16) .T.T...TA..C.GC.TTA..C...CAATCA.CTG...G.C..TACACC.....C.....C.....
rpoD12          (4)  .T.T...TA..C.GC.TTA..C.G.GCAATCA.CTG...G.C..TACACC.....C.....C.....
rpoD1           (1)  .T.T...TA..C.GC.TTA..C.G.GCAATCA.CTG.....C.CC.C
rpoD4           (4)  .....T....C.T.G...A.....T...C.....C.CC.C
rpoD2           (1)  ATT.TCTT..CC..C.T.A...AG..C.....T...C.....
rpoD3           (4)  .....T.....A.....C.....T...C.....
rpoD5           (1)  .....G...G.....AC.....T...C.....
rpoD7           (1)  .....G.....C.....T...C.....
rpoD8           (3)  .....T.....C.....T...C.....
rpoD9           (4)  .....T.....A.....TGT....CA..C...G..C....C....C
rpoD10          (1)  .....T.....A.....T.GTCAA...A...CTA.GCGTGAGTCGCCCC.C
rpoD6           (1)  .....T..T.....TC.G.G.....T.GTCAA...A...G..C....C....TC
rpoD13         (1)  .....C.T.....A.....T.GTCAA...A..C.....C....C....TC

```

Figure 4.5: Polymorphic sites of the *rpoR* gene fragment studied. The position and the site that differed from the consensus are shown; those that were identical are indicated by a point. Informative polymorphic sites are indicated by i.

also calculated and represented by a P value (should be below 0.05 for a 95% confidence level). Six of the eight loci had not enough informative sites (<10) to perform this analysis. The two homoplasmy ratios measured for *fyuA* and *rpoR* differed significantly from zero, *fyuA* H = 0,327 (P= 0,001) and *rpoR* H = 0,209 (P = 0,023) suggesting that an excess of homoplasmy was detected brought by recombination.

4.4 Discussion

4.4.1 Genetic cohesion of *X. campestris* species

MLSA and MLST confirm that *X. campestris* forms a well circumscribed genomic species as previously found by Vauterin *et al.* (1995) and Rademaker *et al.* (2005): almost all alleles at each locus were specific to *X. campestris* when compared with strains of *X. axonopodis* and *X. oryzae* used as out-groups and with strains representative of all other *Xanthomonas* species as well (data not shown). This analysis supports the fact that MLSA could supplant the DNA-DNA hybridization to defined species in future. Gevers *et al.* (2005) based their species delineation on the ecotype concept defined by Cohan (2001): “Ecotypes are defined as populations that are genetically cohesive and ecologically distinct. Cohesion results from periodic selection events that recurrently purge each ecotype of its genetic diversity”. Therefore, it is clear that *X. campestris* species is an ecotype because all strains are genetically close to each other as supported by our results and other (Vauterin *et al.*, 1995; Rademaker *et al.*, 2005; Vicente *et al.*, 2006) and they are all ecologic associated to cruciferous plants. The eight loci chosen were polymorphic and were not subjected to positive selection as demonstrated by the two selection tests performed in this study (Table 4.3). The percentage of variable sites was comparable to *Salmonella* (3,3 to 5,6%) (Kotetishvili *et al.*, 2002) but higher than seen in *Myxococcus xanthus* (0,7 to 2,4%) (Vos and Velicer 2006) and considerably less than in *Helicobacter pylori* (19,8 to

23,7%) (Solcà *et al.*, 2001). Distinct alleles were identified among and within *X. campestris* pathovars. It indicates a high degree of genetic diversity and it is consistent with data obtained by other experimental methods (Alvarez *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2000; Massomo *et al.*, 2003; Tsygankova *et al.*, 2004; Vicente *et al.*, 2006 Valverde *et al.*, 2007). This suggests that *X. campestris* is a heterogeneous species which have evolved since a long time ago.

4.4.2 Pathovars are complex genetic structures

As explained in the introduction, *X. c. pv. raphani*, *X. c. pv. campestris* and *X. c. incanae* are ecologically distinct. Interestingly, genetic analyses also evidenced a clear delineation between strains of these three pathovars. These observations are in accordance with results obtained by Vicente *et al.* (2006), Rademaker *et al.* (2005), Massomo *et al.* (2003), Zhao *et al.* (2000), and Alvarez *et al.* (1994). MLSA approach is more informative.

We showed that the pathovar *X. c. pv. campestris* was split into two phylogenetic groups (Xcc 1 and Xcc 2), that shared many alleles. Three clonal complexes were identified within this pathovar. At the opposite, each strain of *X. c. pv. raphani* was genetically unique, and for two of them shared only two alleles. We calculated an allelic diversity index among alleles within each pathovars (number of different alleles at each locus divided by the strain number within a pathovar group). The allelic diversity index was 17,6% for *X. c. pv. campestris* and 87,5% for *X. c. pv. raphani*, confirming how heterogeneous is the pathovar *raphani* and that it might have diverged from an ancestral *X. campestris* since a long time ago. However no *raphani* cluster was supported by a high bootstrap value except the clustering of strains 756C and CFBP 5829. Strain 756C, whose genome is under sequencing, is considered as the model strain of non vascular *X. campestris* pathogen. This strain was historically identified as a *X. c. pv. armoraciae*. Similarity of symptoms and host range previously showed between pathovars *armoraciae* and *raphani* (Vicente *et al.* 2006, Fargier and Manceau, 2007), is thus doubled

by a genetic relatedness. These results are in favour of a synonymy between these two pathovars. Another nomenclatural problem arises from the wrong designation of the type strain of pathovar *armoraciae*. This strain (CFBP 3838), isolated from *Iberis*, induces black rot on *Iberis* leaves contrary to *armoraciae* strains which induce leaf spot to a wide range of cruciferous plants (Fargier and Manceau, 2007). MLSA and MLST analyses clearly classified this strain among the pathovar *campestris*. Detailed bibliographic studies and taxonomic skills are needed to resolve these nomenclatural ambiguities.

MLSA grouped the five strains of *X. c.* pv. *incanae* with non pathogenic strains and the weakly pathogenic strain CFBP 5814 in a cluster supported by a high bootstrap value. The four *X. c.* pv. *incanae* strains pathogenic on *Matthiola* sp. were strictly genetically identical at the eight loci, despite their various geographical origins (France and USA) and years of isolation (1949 to 1981). Thus it might be hypothesized that they are tightly adapted to this specific host. Clearly the pathogen of *Cheiranthus* sp., classified in *X. c.* pv. *incanae*, is genetically distinct from the pathogens of *Matthiola* sp., as Vicente *et al.* (2006) showed. However they share the unique allele *dnaK* 8 and their *glnA* sequences are very similar (data not shown). These observations suggest that they have a past in common but their different host may have played a role in their divergence. Bradbury (1986) already mentioned that this pathovar was reported either on *Matthiola* sp. or on *Cheiranthus* sp. Do these two pathogens have a significant importance to be split into two pathovars so that phytopathologists and ornamental flowers business could clearly distinguish them as suggested by Vicente (2006)? Hence if it is necessary to rename this pathovar therefore this special pathogen of *Cheiranthus* sp. should be name pv. *cheiranthiae*. The STs, CCs and clusters identified were not related to the origin of isolates. Indeed, *X. campestris* is a seed borne bacterium (Cook *et al.*, 1952) and the epidemic site origin was not always related to origin of the seed because the business seed is world wide.

Similarly, no correlation could be made between races and genetic groups.

Except race 7 only found in ST 17, strains of the same race were spread over several STs and CCs. However, we can mention that race 8 was exclusively found in Xcc2 cluster and races 1, 5, 6 and 7 in Xcc1 cluster. The races/cultivars specificity is based on specific interaction between bacterial effectors and plant receptors. Avr genes that code bacterial effectors are under positive or negative selection by the susceptible and resistant plants. They may be horizontally transferred, creating incongruence between phylogenetic clusters and race typing.

4.4.3 Evidence of intraspecies recombination within *X. campestris*

Cohan (2001) suggested that periodic selection provides cohesion within an ecotype by purging the ecological and genetic diversity until adaptive mutants able to escape this diversity-purging effects form separate ecotypes. Hence, with respect to periodic selection, multiple clusters could be unstable within an ecotype. In *X. campestris* we observed multiple clusters corresponding to the 3 pathovars that cause three different diseases and strains that are weak or non pathogenic. The population structure of *X. campestris* does not fit with the periodic selection model. However Cohan (2001) suggests also that the low level of recombination between nascent bacterial species might promote their coexistence sin hinders their speciation. It might be the case within *X. campestris*.

Evidence of past recombination events comes from clear incongruence on genes. When additional test for recombination were performed, it is clear that recombination events were more important than the accumulation of point mutation in the evolution of *X. campestris* genome. Nevertheless, the ratio r/m is not significantly lower enough to destroy the clonal structure of *X. campestris*. This species appears to have low ration of recombination to point mutation (1,5:1) when compared with high recombining bacteria. For example *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* have re-

spectively ratios 8,9:1 and 4,75:1 on a per allele basis (Feil *et al.*, 2001). But in comparison with other phytopathogenic bacteria, the ratio r/m of *X. campestris* is a little bit higher than those observed within *Xyloella fastidiosa* populations (0,46:1) (Scally *et al.*, 2005) and within *Pseudomonas syringae* populations (1:1) (Sarkar and Guttman, 2004).

Split decomposition graphs of the individual gene tree and of the concatenated sequences were also indicative of recombination and the maximum chi-squared test did find evidence of recombination in *rpoR* gene. Two cases of homoplasy brought by recombination were detected in *fyuA* gene (H = 0,327) and *rpoR* (H = 0,209). These ratios indicated an intermediate frequency of recombination in a same order of magnitude to that observed for *Porphyromonas gingivalis* (Koelher *et al.*, 2003) and *Neisseria meningitidis* (Suerbaum and Achtman, 1999). It was clearly lower than this observed in the panmictic population of *Helicobacter pylori* (H = 0,85) and higher than this observed in the clonal population of *Borrelia burgdoferi* (H = 0,06) (Suerbaum and Achtman, 1999). We therefore infer that exchanges of DNA do occur within the species *X. campestris*. However, the support for a linkage disequilibrium scenario by the *IA* test indicates that recombination events are rare and do not lead to a panmictic population. This phenomenon combining recombination events and a clonal structure of the population was also observed within *Myxococcus xanthus* (Vos and Velicer 2006) and *Porphyromonas gingivalis* (Enersen *et al.*, 2006).

The maintenance of diversity within *X. campestris* might be facilitate by its crops environment. This pathogen is a seed borne bacteria (Cook *et al.*, 1952) able to survive in plant debris, on none host plants, and on weed (Williams, 1980). Seeds have world wide origins and the adaptive genotypes from different origins are currently shuffled by human activities and business. Recombination between *X. campestris* strains may occur on plant debris after crops harvest and during the epiphytic colonisation on leaves by biofilm structures (Jacques *et al.*, 2005; Boureau *et al.*, 2004).

It has been shown that *X. campestris* is able to received foreign DNA by phage and plasmid transformation (Kamdar *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1999; Castañeda *et al.*, 2005), hence there is evidence for horizontal gene transfer between members of *Xanthomonas* genus (Comas *et al.*, 2006). We think these scarce events of recombination permit to hold together this species and promote the coexistence of pathovars that may in future correspond to clearly distinct ecotypes.

Our study provides evidence of high genetic diversity, brought with equally importance by recombination events and accumulation of point mutations. However, *X. campestris* remains a species with a clonal evolution. Differential adaptation to cruciferous hosts explains part of the diversity observed, but other selective pressures might exist.

We proposed an eight loci scheme for molecular typing of the phytopathogen *Xanthomonas* species including four genes previously used to study *X. arboricola* population structure (Boudon *et al.*, 2005). This MLST scheme may be useful for comparative study within *Xanthomonas* genus. Therefore we recommended to use the following loci *atpD*, *dnaK*, *efP*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB*, *rpoR* and *tpiA*.

Acknowledgements

This work was supported by INRA, GEVES, the “Programme semence” funded by the Région Pays de la Loire, the Conseil Général du Maine-et-Loire and Angers Loire Métropole, and the Bureau des Ressources Génétiques. E. Fargier was supported by a grant from GEVES, France and from Région Pays de la Loire, France. This project has been supported by OUEST-genopole[®] genotyping core facility.

Données complémentaires

Application de la MLSA pour définir les espèces au sein du genre *Xanthomonas*

Parallèlement à l'analyse MLST/MLSA de l'espèce *X. campestris*, l'un des projets du laboratoire est d'étudier les relations génétiques entre les espèces du genre *Xanthomonas*. Ce projet est mené en collaboration avec les laboratoires du CIRAD à la Réunion (O. Pruvost) et de l'IRD de Montpellier (V. Verdier).

Nous avons fait séquencer un fragment d'environ 500 pb dans les 4 gènes de ménage *atpD*, *dnaK*, *efP* et *gyrB* pour 52 souches appartenant au genre *Xanthomonas* (Tableau 4.6). Plus précisément, nous avons des souches appartenant à 4 pathovars de l'espèce *X. arboricola* et 12 pathovars de l'espèce *X. axonopodis* (pv. *axonopodis*; pv. *alfalfae*; pv. *allii*; pv. *aurantifolii*; pv. *begoniae*; pv. *citri*; pv. *citrumelo*; pv. *glycines*; pv. *malvacearum*; pv. *manihotis*; pv. *phaseoli*; pv. *phaseoli* var. *fuscans* et pv. *vesicatoria*). Parmi les 52 souches, nous avons intégré 2 pathovars non reclassés par Vauterin *et al.*, (1995) et Rademaker *et al.*, (2005), toujours inclus dans l'espèce *X. campestris* (pv. *betae* et pv. *bilvae*), ainsi qu'au moins une souche appartenant aux espèces *X. albilineans*; *X. cassavae*; *X. codiae*; *X. cucurbitae*; *X. cynarae*; *X. hortorum*; *X. hyacinthi*; *X. melonis*; *X. oryzae*; *X. pisi*; *X. translucens* et *X. vesicatoria*. Nous avons également inclus à notre analyse les 3 pathovars de l'espèce *X. campestris* que nous avons caractérisés lors de notre précédente étude, ainsi que les souches séquencées *X. axonopodis* pv. *citri*; str. 306 (da Silva *et al.*, 2002); *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* type A; str. 85-10 (Thieme *et al.*, 2005); *X. oryzae* pv. *oryzae* race 1; MAFF 311018 (Ochiai *et al.*, 2005) et *X. oryzae* pv. *oryzae* race 1; KACC10331 (Lee *et al.*, 2005).

Nous avons concaténé les données de séquences des 4 gènes pour chacune des 62 souches étudiées, et nous avons construit un arbre phylogénétique avec

Données complémentaires

	Noms des souches	Numéro	Autres collections	Hôte
2523X_albi	<i>X. albilineans</i>	CFBP 2523 ^T	LMG 494, NCPPB 2969	<i>Saccharum officinarum</i>
1846Xar_co	<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	CFBP 1846		<i>Corylus avellana</i>
2528Xar_ju	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	CFBP 2528 ^T	LMG 747, NCPPB 411	<i>Juglans regia</i>
3123Xar_po	<i>X. arboricola</i> pv. <i>populi</i>	CFBP 3123 ^{Pt}	LMG 12141	<i>Populus x canadensis</i>
2535Xar_pr	<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	CFBP 2535 ^{Pt}	LMG 852, NCPPB 416	<i>Prunus salicina</i>
4924Xa_axo	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	CFBP 4924 ^T	LMG 538, NCPPB 457	<i>Axonopus scoparius</i>
3836Xa_alf	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>alfalfae</i>	CFBP 3836 ^{Pt}	LMG 497, NCPPB 2062	<i>Medicago sativa</i>
6107Xa_all	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	CFBP 6107		<i>Allium fistulosum</i>
3528Xa_aur	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> (citri groupe C)	CFBP 3528		<i>Citrus limon</i>
2524Xa_beg	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	CFBP 2524 ^{Pt}	LMG 7303, NCPPB 1926	<i>Begonia</i> sp.
2866Xa_cii	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (citri groupe C)	CFBP 2866	NCPPB 3233	<i>Citrus aurantiifolia</i>
3369Xa_cii	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (citri groupe A)	CFBP 3369	LMG 9322	
Xa_cii306	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (citri groupe A)	306	da Silva <i>et al.</i> , 2002	
3371Xa_cio	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>	CFBP 3371 ^{Pt}	LMG 9325	
2526Xa_gly	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	CFBP 2526 ^{Pt}	LMG 712, NCPPB 554	<i>Glycine hispida</i>
2530Xa_mal	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	CFBP 2530 ^{Pt}	LMG 761, NCPPB 633	<i>Gossypium hirsutum</i>
2603Xa_man	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	CFBP 2603	NCPPB 2443	<i>Manihot esculenta</i>
2534Xa pha	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP 2534 ^{Pt}	NCPPB 3035	<i>Phaseolus vulgaris</i>
412Xa phas	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP 412		<i>Phaseolus vulgaris</i>
4834Xa pha	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP 4834		<i>Phaseolus vulgaris</i>
162-2Xa_ph	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	JW162.2		
214-3Xa_ph	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	JW214.3		
162-11Xa_p	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	JW162.11		
355-5Xa_ph	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	JW355.5		
353-1Xa_ph	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	JW353.1		
162-1Xa_ph	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	JW162.1		
1505Xa pha	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP 1505		<i>Phaseolus vulgaris</i>
1815Xa pha	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP 1815		<i>Phaseolus</i> sp.
1845Xa pha	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP 1845		<i>Phaseolus</i> sp.
6165Xa pha	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP 6165	LMG 826, NCPPB 381	<i>Phaseolus vulgaris</i>
6167Xa pha	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP 6167	LMG 7511	<i>Phaseolus</i> sp.
1604Xa ves	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> type A	CFBP 1604		<i>Capsicum annuum</i>
2484Xa ves	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> type A	CFBP 2484		<i>Lycopersicon esculentum</i>
Xa_ve85-10	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> type A	85-10	Thieme <i>et al.</i> , 2005	
3629X_brom	<i>X. bromi</i>	CFBP 3629		<i>Bromus sitchensis</i>
5825Xc_bar	<i>X. campestris</i>	CFBP 5825 ^{Pt}	LMG 547, NCPPB 983	<i>Barbarea vulgaris</i>
1121Xc_cam	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	CFBP 1121		<i>B. oleracea</i> cv. <i>bullata gemmifera</i>
5241Xc_cam	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	CFBP 5241 ^T	LMG 568, ATCC 33913	<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>
756CXc_arm	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	756C	Kamdar <i>et al.</i> , 1993	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>
5827Xc_rap	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	CFBP 5827 ^{Pt}	LMG 860, NCPPB 1946	<i>Raphanus sativus</i>
1371Xc_inc	<i>X. campestris</i> pv. <i>incanae</i>	CFBP 1371		<i>Matthiola incana</i>
5852Xc_bet	<i>X. campestris</i> pv. <i>betae</i>	CFBP 5852	LMG 9040, NCPPB 2592	<i>Beta vulgaris</i>
3135Xc_bil	<i>X. campestris</i> pv. <i>bilvae</i>	CFBP 3135	NCPPB 1759	<i>Feronia elephantacum</i>
3136Xc_bil	<i>X. campestris</i> pv. <i>bilvae</i>	CFBP 3136 ^{Pt}	NCPPB 3213	<i>Aegle marmelos</i>
4642X_cass	<i>X. cassavae</i>	CFBP 4642 ^T	LMG 673, NCPPB 101	<i>Manihot esculenta</i>
4690X_codi	<i>X. codiae</i>	CFBP 4690 ^T	LMG 8678	<i>Codiacum variegatum</i>
2542X_cucu	<i>X. cucurbitae</i>	CFBP 2542 ^T	LMG 690, NCPPB 2597	<i>Cucurbita maxima</i>
4210X_cyna	<i>X. cynarae</i>	CFBP 4210		<i>Senebiera</i> sp.
2533Xh_pel	<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	CFBP 2533 ^{Pt}	LMG 7314, NCPPB 2985	<i>Pelargonium peltatum</i>
410Xh_tara	<i>X. hortorum</i> pv. <i>taraxaci</i>	CFBP 410 ^{Pt}	LMG 870, NCPPB 940	<i>Taraxacum kok-sahgyz</i>
1156X_hyac	<i>X. hyacinthi</i>	CFBP 1156 ^T	LMG 739, NCPPB 599	<i>Hyacinthus orientalis</i>
4644X_melo	<i>X. melonis</i>	CFBP 4644 ^T	LMG 8670, NCPPB 3434	<i>Cucumis melo</i>
Xoo_KACC	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> race 1	MAFF 311018	Ochiai <i>et al.</i> , 2005	<i>Oryza sativa</i>
Xoo_MAFF	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> race 1	KACC10331	Lee <i>et al.</i> , 2005	<i>Oryza sativa</i>
2286Xor_or	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	CFBP 2286 ^{Pt}	LMG 797, NCPPB 1585	<i>Oryza sativa</i>
4643X_pisi	<i>X. pisi</i>	CFBP 4643 ^T	LMG 847, NCPPB 762	<i>Pisum sativum</i>
1817X_popu	<i>X. populi</i>	CFBP 1817 ^T	LMG 5743	<i>Populus x canadensis</i>
2053Xt_gra	<i>X. translucens</i> pv. <i>graminis</i>	CFBP 2053 ^{Pt}	LMG 726, NCPPB 2700	<i>Dactylis glomerata</i>
2054Xt_tra	<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i>	CFBP 2054 ^T	LMG 876, NCPPB 973	<i>Hordeum vulgare</i>
1545X_vesi	<i>X. vesicatoria</i> type B	CFBP 1545		<i>Lycopersicon esculentum</i>
2537X_vesi	<i>X. vesicatoria</i> type B	CFBP 2537 ^T	LMG 911, NCPPB 422	<i>Lycopersicon esculentum</i>
2625X_vesi	<i>X. vesicatoria</i> type B	CFBP 2625		

pt, souches pathotype; T, souche type

TAB. 4.6 – Liste des bactéries appartenant au genre *Xanthomonas* utilisées en MLSA

Neighbor-Joining réalisé avec le programme Neighbor de PHYLIP (Felsenstein, 2005) et 1000 répliques bootstrap (figure 4.6).

Les souches appartenant aux espèces *X. arboricola*; *X. campestris* et *X. oryzae* forment des lignées bien identifiées au sein du genre *Xanthomonas* et ces groupes sont soutenus par de fortes valeurs de bootstrap. Au sein de l'espèce *X. oryzae* les deux souches (Xoo_MAFF et Xoo_KACC) appartenant au pathovar *oryzae* sont également associées ensemble et séparées de la souche *X. oryzae* pv. *oryzicola*.

Parmi les trois souches appartenant à l'espèce *X. vesicatoria* seules deux souches (2537X_vesi et 1545X_vesi) sont groupées ensemble, la troisième (2625X_vesi) est incluse dans un groupe contenant des souches appartenant aux espèces *X. hortorum*; *X. populi* et *X. cynarae*, ces dernières sont unies par une forte valeur de bootstrap. Il conviendra de vérifier l'identité de cette souche en évaluant notamment son pouvoir pathogène sur la tomate et le poivron.

Un groupe, qui semble beaucoup plus éloigné des autres espèces du genre *Xanthomonas*, est composé de souches appartenant aux espèces *X. albilineans*; *X. cucurbitae*; *X. hyacinthi* et *X. translucens*. Dans les travaux de Rademaker *et al.* (2005), basés sur les profils moléculaires des espèces du genre *Xanthomonas* obtenus par rep-PCR, les espèces *X. albilineans*; *X. hyacinthi* et *X. translucens* sont également regroupées. En revanche, l'espèce *X. cucurbitae* est regroupée avec l'espèce *X. bromi*. Toutes les souches de notre collection appartenant à l'espèce *X. axonopodis* (Vauterin *et al.*, 1995) ont été groupées ensemble, néanmoins la valeur de bootstrap soutenant ce groupe n'est pas très élevée. Les souches reçues sous le nom de *X. campestris* pv. *bilvae* (3135Xc_bil et 3136Xc_bil) et *X. campestris* pv. *betae* (5852Xc_bet) isolées respectivement de plantes de la famille des Rutacées (agrumes) et des Chenopodiacées (betterave), non reclassées par Vauterin *et al.* (1995) ne font pas partie de l'espèce *X. campestris* : ces bactéries ont été groupées au sein de l'espèce *X. axonopodis*.

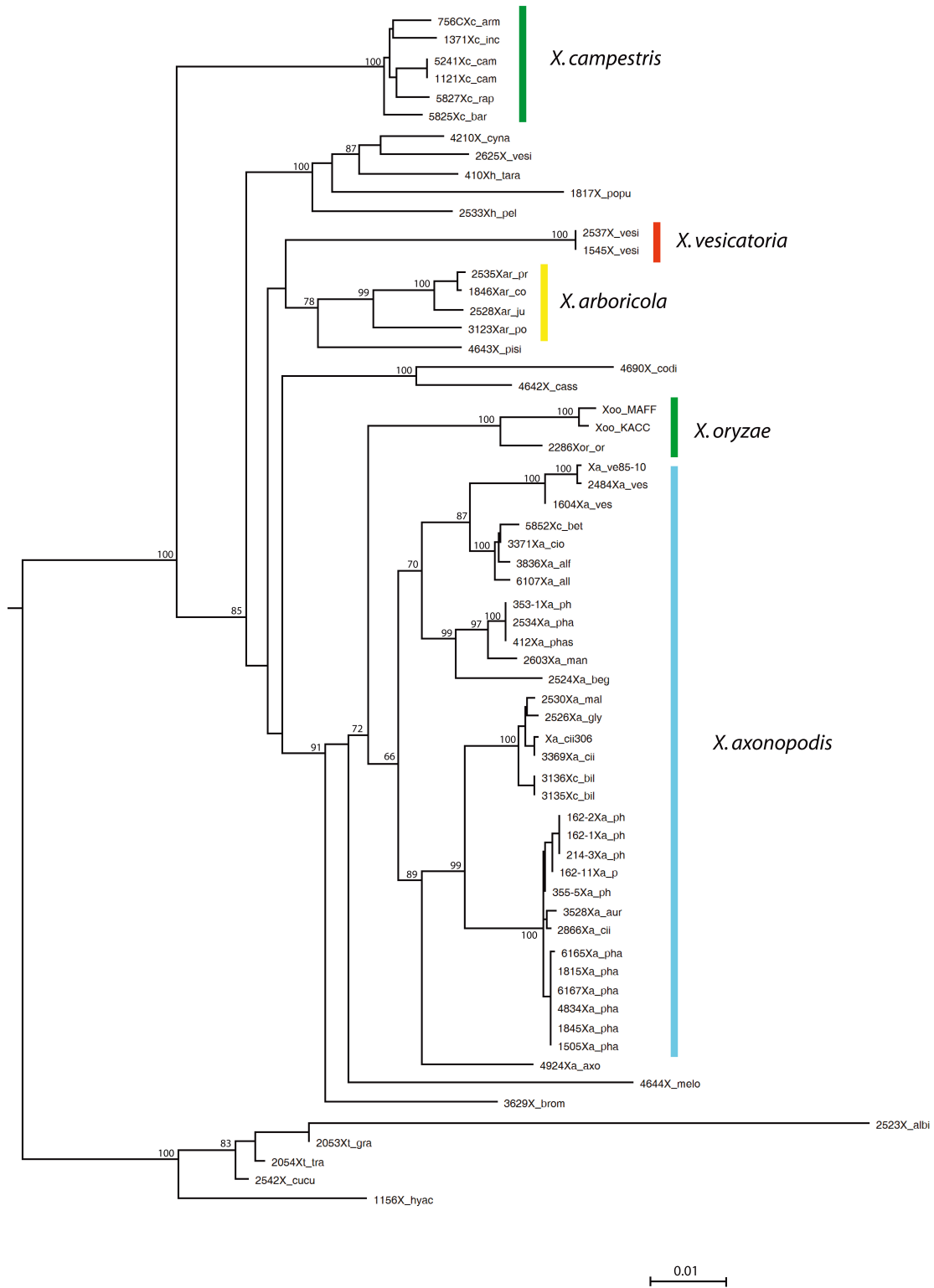


FIG. 4.6 – Neighbor-Joining du genre *Xanthomonas* à partir des données concaténées de séquences partielles de quatre gènes de ménage (*atpD*, *dnaK*, *efP* et *gyrB*).

Les valeurs de bootstrap (≥ 60) après 1000 simulations sont représentées sur cette figure. Pour la correspondance des noms des souches se reporter au tableau 4.5.

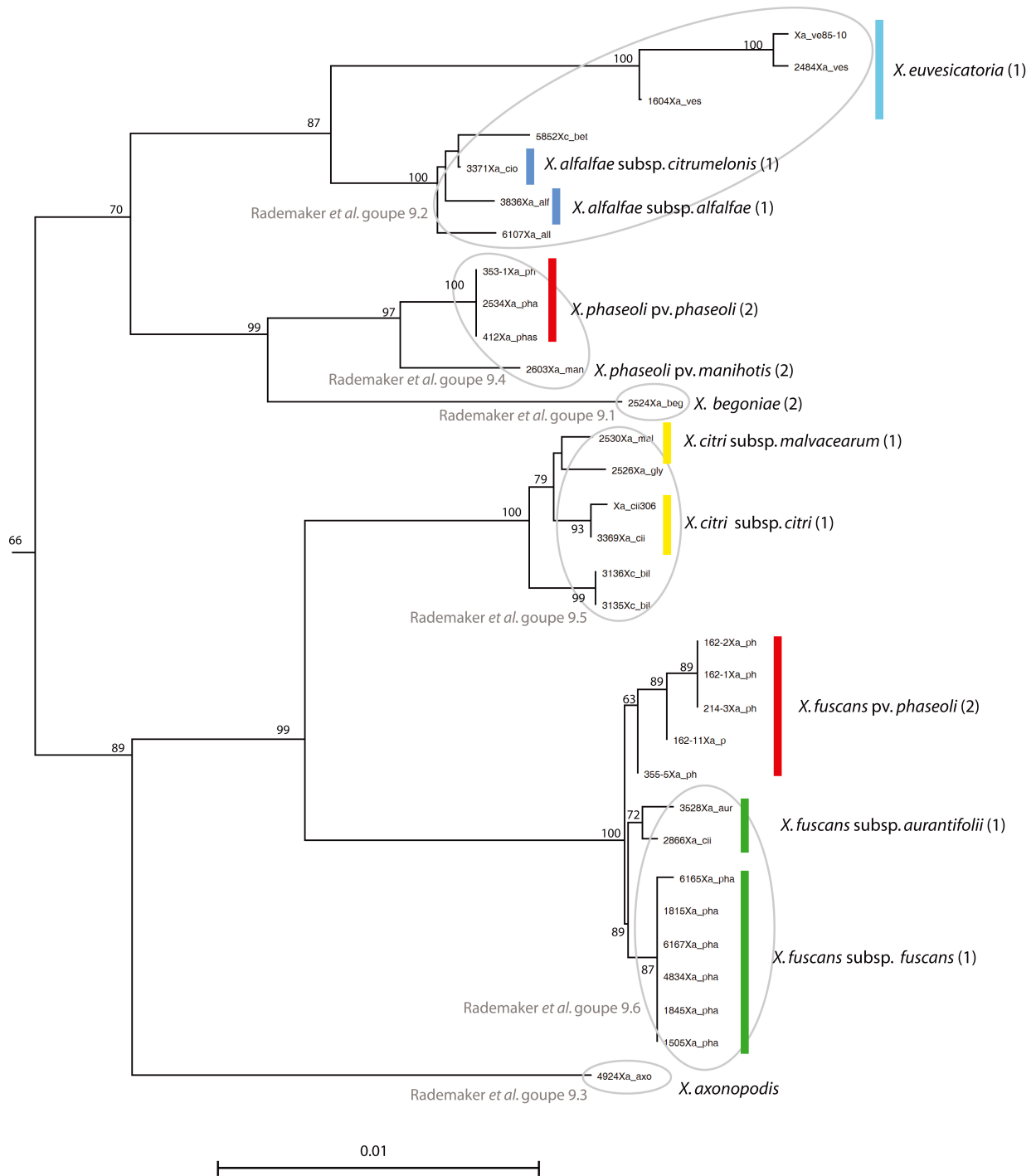


FIG. 4.7 – Visualisation de l'espèce *X. axonopodis* issu de l'arbre Neighbor-Joining du genre *Xanthomonas* à partir des données concaténées de séquences partielles de quatre gènes de ménage (*atpD*, *dnaK*, *efP* et *gyrB*).

Les valeurs de bootstrap (≥ 60) après 1000 simulations sont représentées sur cette figure. Pour la correspondance des noms des souches se reporter au tableau 4.6. Les regroupements établis par Rademaker et al. (2005) sont représentés sur cette figure.

(1) Nouvelles espèces proposées par Jones et al. (2004) et Schaad et al. (2005) ;

(2) Nouvelles espèces proposées dans cette étude.

Dans leurs travaux, Rademaker *et al.* (2005), subdivisent l'espèce *X. axonopodis* en six sous groupes regroupant certains pathovars de cette espèce. Nous avons reporté sur la figure 2 ces différents groupes. Depuis 1995, comme nous l'avons précisé dans le chapitre 1 de l'introduction, quatre nouvelles espèces ont été incluses au genre *Xanthomonas* : *X. cynarae* (Trébaol *et al.*, 2000), *X. euvesicatoria* (Jones *et al.*, 2004), *X. gardneri* (Jones *et al.*, 2004), *X. perforans* (Jones *et al.*, 2004) et trois autres sont en attente de validation : *X. alfalfae*; *X. citri* et *X. fuscans* (Schaad *et al.*, 2005; M. Le Saux communication personnelle) *X. euvesicatoria*; *X. gardneri* et *X. perforans* sont des souches anciennement nommées *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* groupe A, groupe B et groupe C respectivement, élevées au rang d'espèce. Dans notre étude nous disposons uniquement des souches de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* groupe A.

Schaad *et al.*, 2005 ont défini également deux sous espèces pour chacune des espèces *X. alfalfae*; *X. citri* et *X. fuscans* — en accord avec la note corrective actuellement en attente de publication — (M. Le Saux, communication personnelle) :

- *X. axonopodis* pv. *alfalfae* devient *X. alfalfae* subsp. *alfalfae*
- *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (citri forme E) devient *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*
- *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var *fuscans* devient *X. fuscans* subsp. *fuscans*
- *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (citri forme B,C et D) devient *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*
- *X. axonopodis* pv. *citri* (citri forme A)devient *X. citri* subsp. *citri*
- *X. axonopodis* pv. *malvacearum* devient *X. citri* subsp. *malvacearum*

Nous avons pris en compte ces modifications de nomenclature et vérifié si chacune des nouvelles espèces proposées était en adéquation avec la phylogénie révélée par notre analyse MLSA (figure 2).

Parmi les six sous-groupes de Rademaker *et al.* (2005) quatre ont clairement

pu être identifiés et soutenus par de fortes valeurs de bootstrap. Dans notre analyse nous n'avions qu'un seul représentant des deux autres groupes 9.1 et 9.3 (2524Xa_beg et 4924Xa_axo respectivement), ces souches se situent en dehors des autres groupes.

Le groupe 9.2 rassemble les souches de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xa_ve85-10, 1604Xa_ves et 2484Xa_ves), *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (3371Xa_cio) et *X. axonopodis* pv. *alfalfae* (3836 Xa_alf). D'autres pathovars sont associés à ce taxon mais n'ont pas été étudiés par Rademaker *et al.* (2005), *X. axonopodis* pv. *allii* (6107Xa_all) et une souche encore identifiée comme *X. campestris* pv. *betae* (5852Xc_bet) car non étudiée par Vauterin *et al.* (1995). Les nouvelles espèces *X. euvesicatoria* (Jones *et al.*, 2004) et *X. alfalfae* (Schaad *et al.*, 2005) ont été identifiées dans ce groupe 9.2.

Les trois souches *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xa_ve85-10, 1604Xa_ves et 2484Xa_ves) sont toutes des *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* de type A formant la nouvelle espèce *X. euvesicatoria* (Jones *et al.*, 2004). Notre analyse MLSA identifie clairement cette espèce.

Le deuxième sous groupe au sein du groupe 9.2 est composé des souches 6107Xa_all, 5852Xc_bet, 3371Xa_cio, 3836 Xa_alf. Ces deux dernières souches sont renommées respectivement *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* et *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* par Schaad *et al.* (2005). Nous retrouvons ces deux souches au sein du même sous-groupe et soutenu par une forte valeur de bootstrap. Les souches *X. axonopodis* pv. *allii* (6107Xa_all) et *X. campestris* pv. *betae* (5852Xc_bet) font probablement partie de la nouvelle espèce *X. alfalfae*. Alavi *et al.* (2004), par une analyse AFLP, montrent que *X. axonopodis* pv. *allii* groupe avec *X. axonopodis* pv. *citrumelo* et *X. axonopodis* pv. *alfalfae*, nous laissant suggérer que le pathovar *allii* serait lui aussi susceptible de changer de nom et d'être reclassé au sein de l'espèce *X. alfalfae*. Des analyses complémentaires sur d'autres souches appartenant à *X. axonopodis* pv. *allii* seront nécessaires pour valider cette hypothèse.

Le groupe 9.4 est formé des souches appartenant à *X. axonopodis* pv.

phaseoli (412Xa_phas, 353.1Xa_ph et 2534Xa_pha) et *X. axonopodis* pv. *manihotis* (2603Xa_man) unies par une forte valeur de bootstrap et conformes aux travaux de Rademaker *et al.* (2005). Ces trois souches de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ont également été utilisées lors d'une analyse AFLP sur le genre *Xanthomonas* (Manceau and Brin, 2003). Les auteurs montrent que ces souches forment un groupe à part des autres *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et des *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*.

Le groupe 9.5 regroupe des souches appartenant aux *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (2530Xa_mal), *X. axonopodis* pv. *glycines* (2526Xa_gly) *X. axonopodis* pv. *citri* (3369Xa_cii et Xa_cii306) en accord avec les travaux de Rademaker *et al.* (2005). Un autre pathovar, non inclus dans les études taxonomiques précédentes, est associé à ce taxon *X. campestris* pv. *bilvae* (3135Xa_bil 3136Xa_bil).

Les souches *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (2530Xa_mal) et *X. axonopodis* pv. *citri* (3369Xa_cii et Xa_cii306), sont renommées respectivement *X. citri* subsp. *malvacearum* et *X. citri* subsp. *citri* par Schaad *et al.* (2005). Nous retrouvons ces trois souches au sein du même sous-groupe et soutenues par une forte valeur de bootstrap. Ainsi notre analyse MLSA soutiendrait également la proposition de Schaad *et al.* (2005) de regrouper sous le même nom d'espèces, *X. citri*, les *X. axonopodis* pv. *malvacearum* et *X. axonopodis* pv. *citri* (*citri* forme A) pathovars au rang d'espèces. Les souches reçues sous le nom de *X. campestris* pv. *bilvae* (3135Xa_bil 3136Xa_bil) et non incluses dans les études taxonomiques précédentes sont pathogènes sur des plantes de la famille des Rutacées (agrumes) (*Feronia elephantacum* et *Aegle marmelos*) suggérant un lien avec l'espèce *X. citri*, pathogène des agrumes également.

Les souches appartenant à *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (3528Xa_aur), *X. axonopodis* pv. *citri* (*citri* forme C) (2866Xa_cii) qui est synonyme de *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* et *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (6165Xa_pha, 1815Xa_pha, 6167Xa_pha, 4834Xa_pha, 1845Xa_pha et 1505Xa_pha) sont unies par une forte valeur de bootstrap et conformément aux travaux

de Rademaker *et al.* (2005) forment Le groupe 9.6.

La nouvelle espèce *X. fuscans* (Shaad *et al.*, 2005) a été clairement identifiée par notre analyse MLSA dans ce groupe 9.6. Nous avons pu également identifier les deux sous-espèces *X. fuscans* subsp. *fuscans* et *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (Shaad *et al.*, 2005) regroupant respectivement les souches anciennement connues sous les noms de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* et *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (citri forme B,C et D).

D'autres souches ont été associées à ce taxon 9.6 : il s'agit de souches appartenant à *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (162.1Xa_ph, 162.2Xa_ph, 214.3Xa_ph, 162.11Xa_p et 355.5Xa_ph) qui n'ont pas été étudiées par Rademaker *et al.* (2005). Elles ont également été utilisées lors d'une analyse AFLP sur le genre *Xanthomonas* (Manceau and Brin, 2003). Les auteurs montrent que les *X. axonopodis* pv. *phaseoli* sont très polymorphes et que ces 5 souches non fuscans sont plus proches des *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* que les *X. axonopodis* pv. *phaseoli* identifiés dans notre analyse au sein du groupe 9.4. Ainsi il semblerait que les souches *X. axonopodis* pv. *phaseoli* non fuscans (162.1Xa_ph, 162.2Xa_ph, 214.3Xa_ph, 162.11Xa_p et 355.5Xa_ph) appartiennent également à l'espèce nouvellement décrite par Shaad *et al.* (2005) et forment une nouvelle sous-espèce au sein de *X. fuscans*.

Notre ébauche d'analyse MLSA sur le genre *Xanthomonas* nous a permis non seulement d'identifier de nombreux groupes correspondant aux différentes espèces déterminées à partir d'hybridations ADN-ADN (Vauterin *et al.*, 1995 ; Jones *et al.* 2004 ; Shaad *et al.*, 2005), mais aussi les différents complexes définis par rep-PCR (Rademaker *et al.* 2005). D'autres souches sont actuellement en cours de séquençage dans le cadre du projet avec nos partenaires, afin de les intégrer à notre analyse pour identifier plus finement les différentes espèces et sous-espèces. Notre étude conforte les conclusions des travaux de Rademaker *et al.* (2005) de Jones *et al.* (2004) et de Shaad *et al.* (2005) montrant l'existence d'une structure en taxon bien identifiée au sein de l'espèce *X. axonopodis* proposée par Vauterin *et al.* (1995). La

polémique au sein de la communauté internationale porte sur le niveau de coupure à fixer pour définir les espèces. Lorsque toute la collection de bactéries du genre *Xanthomonas* du projet en cours aura été étudiée, ce travail basé sur la MLSA permettra de proposer un niveau de coupure avec des arguments phylogénétiques plus solides que les études de diversité actuellement publiées, et devrait éclaircir la taxonomie de ce genre. De ce travail préliminaire ressort plusieurs propositions :

- i) Créer de nouvelle espèce : *X. phaseoli* qui regrouperait deux pathovars le pv. *phaseoli* et le pv. *manihotis*, *X. begoniae* qui regrouperait les souches *X. axonopodis* pv. *begoniae* du groupe 9.1 étudiées par Rademaker *et al.* (2005).
- ii) Intégrer dans l'espèce *X. fuscans* sous le nom de *X. fuscans* pv. *phaseoli* les souches groupant avec les autres souches de l'espèce *X. fuscans* et qui ne produisent pas de pigment caractéristique des souches *X. fuscans* subsp. *fuscans*.

Schaad *et al.* (2005) proposent d'abandonner le terme pathovar au profit de subspecies pour désigner les sous-espèces à l'intérieur des espèces nouvellement décrites. Nous ne pensons pas que ce soit souhaitable. En effet, ce niveau de regroupement correspond à des souches qui partagent le même caractère de pathogénie.

L'analyse phylogénétique du genre *Xanthomonas* met en évidence des incongruences entre les groupes phylogénétiques obtenus et les pathovars définis par rapport à la réponse d'une plante à l'infection par ces bactéries. Plusieurs espèces contiennent des sous-groupes responsables d'une même maladie sur une plante donnée sur un hôte donné. Les agents de la graisse commune du haricot en sont l'illustration. Deux groupes phylogénétiques qui pourraient être proposés au rang d'espèce *X. phaseoli* et *X. fuscans* contiennent des souches qui expriment le même pouvoir pathogène sur haricot (*Phaseolus* sp.) *X. phaseoli* pv. *phaseoli* et *X. fuscans* pv. *phaseoli*. Les souches identifiées par Schaad *et al.* (2005) comme *X. fuscans* subsp. *fuscans* pourraient

être identifiées comme *X. fuscans* pv. *phaseoli* variant *fuscans* ce qui permettrait d'harmoniser la taxonomie et de traduire la caractéristique des souches à constituer une lignée particulière caractérisée par la production de pigment mélanisé dans le milieu de culture.

Chapitre 5

Mise au point de nouveaux outils de diagnostic pour la détection des *X. campestris* dans les semences de Brassicacées

Contexte scientifique

La France est le premier producteur européen de semences potagères, et le second producteur mondial après les États-Unis. Les quantités de production de semences pour l'ensemble des choux représentent 111 543 kg pour des surfaces de production grainière de 196 hectares (chiffres 2003-2004, FNPS). Le marché des semences de choux-fleurs et de choux (vente à la graine) se situe autour de 750 millions de graines, pour une valeur de 28 millions d'euros. La vente aux professionnels est effectuée sous forme de plants qui sont produits par des établissements spécialisés. La valeur du marché du plant se situe à 23,5 millions d'euros (chiffres 2003-2004, FNPS). Les pertes de productions

liées aux maladies d'origine bactérienne et fongique ont de lourdes conséquences économiques. La nervation noire provoquée par *X. c. pv. campestris* est considérée comme la maladie la plus destructrice des Brassicacées cultivées (Williams, 1980). Les bactéries responsables de la maladie des taches foliaires des Brassicacées cultivées sont également responsables de nombreuses pertes de production (Zhao *et al.*, 2000 ; 2002). Bien que les origines de contamination de ces maladies bactériennes soient multiples, la semence reste la principale source d'infection des plantes. La présence de 3 à 5 graines infectées sur 10 000 suffit à avoir une incidence élevée de la maladie en culture (Schaad, 1980). Ainsi le taux de contamination des lots de semences ne doit pas excéder une graine sur 30 000 dans les lots de semences commercialisées (Franken *et al.*, 1991).

Le contrôle sanitaire des semences repose sur des méthodes de détection des bactéries dans des échantillons de semences. Les méthodes de détection conventionnelles des bactéries, font appel aux propriétés microbiologiques des bactéries — isolement sur milieu nutritif sélectif. Deux protocoles sont actuellement disponibles : l'un, largement utilisé dans les laboratoires français, proposé par le LNPV (Laboratoire National de la Protection des Végétaux) correspondant à la méthode BHs/99/05b. Le second est la méthode de référence ISTA (International Seed Testing Association) disponible sur leur site sous le nom : « 7-019 : *Detection of Xanthomonas campestris pv. campestris on Brassica spp* » (Roberts and Koenraadt, 2006). Ces méthodes ont comme principales limites d'être coûteuses et d'imposer un délai de réponse de plusieurs semaines, si les lots sont infectés (Chitarra *et al.*, 2002 ; Tsygankova *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2004 ; Berg *et al.*, 2005, 2006). A l'inverse, les méthodes de détection moléculaire apportent une réponse rapide et spécifique (Shih *et al.*, 2000 ; Schaad *et al.*, 2001). Cependant, ces techniques, basées sur l'amplification de l'ADN, ne renseignent pas sur la viabilité des germes présents dans l'échantillon car une amplification peut être obtenue théoriquement à partir d'ADN de cellules mortes (Josephson *et al.*, 1993 ; Masters *et*

al., 1994). Or la législation nationale et internationale sur le développement de techniques de désinfection des semences devrait imposer désormais que les techniques de détection utilisées soient capables de certifier l'absence de germes vivants dans l'échantillon.

C'est pourquoi l'un des objectifs de cette thèse était de proposer un nouvel outil de détection fiable et rapide, permettant de détecter les bactéries vivantes appartenant aux pathovars de *X. campestris* dans les lots de semences de Brassicacées.

Lors de travaux préliminaires à cette étude, nous avons recherché des marqueurs moléculaires de la viabilité spécifiques de *X. c. pv. campestris* afin de mettre au point une technique de détection des ARN par RT-PCR. En effet les ARN messagers — intermédiaires de la synthèse des protéines — sont rapidement dégradés par les ribonucléases après la mort de l'organisme. Ils ne sont donc présents que dans les cellules vivantes (Klein *et al.*, 1997; Sheridan *et al.*, 1998). Cependant l'élaboration d'une telle technique s'est révélée particulièrement complexe, l'ARNm étant une molécule d'acide nucléique très instable et difficile à utiliser en routine. L'une des étapes clés de la méthode est d'éliminer l'ADN génomique qui pourrait être à l'origine de résultats faux positifs. Or nous ne sommes pas parvenus à nous affranchir des contaminations d'ADN, les réactions d'hydrolyse des ADN étant d'efficacité variable. La performance RT-PCR est également fortement réduite par la présence de ribonucléases et d'inhibiteurs libérés par les semences. La mise au point de la procédure d'amplification des ARN messagers a été effectuée : cette technique s'étant révélée inadaptée à l'objectif visé a été abandonnée.

Nous nous sommes donc orientés vers une nouvelle technique de détection des bactéries vivantes : la BIO-PCR. C'est une méthode qui combine la croissance du pathogène sur un milieu semi sélectif, suivi d'une amplification spécifique par PCR de l'ADN des bactéries (Schaad *et al.*, 1995). Elle a l'avantage i) d'éliminer les inhibiteurs de PCR, ii) de réduire la chance d'obtenir de faux positifs en raison de la présence éventuelle de cellules mortes ou d'ADN libre,

iii) d'augmenter significativement la sensibilité grâce à un pré-enrichissement des cellules cibles et vi) d'informer sur la viabilité des cellules (Schaad *et al.*, 1995).

La première étape était de mettre au point un milieu de culture semi-sélectif aux *X. campestris* limitant la croissance de la microflore naturelle des graines de Brassicacées. Ensuite nous devons proposer, des couples d'amorces spécifiques et permettant d'obtenir un bon rendement de PCR classique et de PCR en temps réel.

Ces travaux font l'objet d'un article intitulé « *Detection of living cells of X. campestris pathovars in crucifer seeds by BIO-PCR* » prochainement soumis dans la revue internationale *Plant Pathology*. Les principales conclusions sont rapportées dans le résumé ci-dessous.

Nous avons élaboré un nouveau milieu semi sélectif pour la détection des *X. campestris* dans les semences. Le milieu YPACvc est un milieu classique additionné de deux antibiotiques céfalexine et de vancomycine, utilisés par ailleurs dans la composition d'autres milieux semi-sélectifs aux *X. campestris*. Le milieu YPACvc a l'avantage de respecter les CMI (concentration minimum inhibitrice) d'une large gamme de souches appartenant à l'espèce *X. campestris*, contrairement au milieu mCS20ABN. En effet la CMI de la néomycine est égale à environ 16 à 32 mg/l pour cette espèce alors que la concentration recommandée dans le milieu mCS20ABN est de 40 mg/l. Ce milieu est à l'origine d'une trop forte sélectivité vis-à-vis de certaines souches appartenant à l'espèce *X. campestris*. Le milieu YPACvc offre une sélectivité satisfaisante contre la microflore sauvage de lots de semences de Brassicacées tout en ne gênant pas la croissance des *X. campestris*.

Plusieurs couples d'amorces disponibles pour la détection des *X. campestris* ont été testés et comparés au couple d'amorces tpiA8R/tpiA8S défini dans cette étude. Il apparaît que les couples d'amorces tpiA8R/tpiA8S et ceux définis par Berg *et al.* 2006 permettent d'obtenir un bon rendement de la PCR ; toutefois le couple d'amorces tpiA8R/tpiA8S assure une meilleure spécificité.

Un temps d'incubation de 36 heures est suffisant pour détecter jusqu'à 10 ufc/ml de macérat de semence. Nous avons également recherché *X. campestris* dans des lots de semences naturellement contaminées par BIO-PCR en utilisant le milieu YPACvc et le couple d'amorces tpiA8R/tpiA8S afin de faire une première validation du test. Tous les lots contaminés ont été confirmés positifs par BIO-PCR. Celle-ci est un outil rapide et sensible pour détecter les *X. campestris* dans les semences de Brassicacées.

Detection of living cells of *X. campestris* pathogenic on crucifers in seeds by BIO-PCR

E. Fargier^{1,2}, B. Briand¹, C. Brin¹, J. Guillaumes¹ and C. Manceau¹

5.1 Introduction

Xanthomonas campestris (Vauterin *et al.*, 1995) is a bacterial species that groups strain pathogenic on cruciferous plants. Six pathovars have been described within *X. campestris*, *X. c.* pv. *campestris*, *X. c.* pv. *aberrans*, *X. c.* pv. *armoraciae*, *X. c.* pv. *incanae* and *X. c.* pv. *raphani* (McCulloch 1929, White 1930; Kendrick and Baker, 1942; Bradbury 1986; William 1980; Zhao *et al.* 2000). Synonymies have been suspected between pathovars (Alvarez *et al.* (1994), Vauterin *et al.* (1995) and Vicente *et al.* (2001, 2006). Fargier and Manceau (2007) and Fargier *et al.* (2007) showed that synonymies does exist and that only three bacterial diseases caused by three pathovars are caused by strains available in international collections of microorganisms : black rot of cruciferous plant caused by *X. c.* pv. *campestris*, leaf spot diseases caused by *X. c.* pv. *raphani* and the bacterial blight of garden Stocks caused by *X. c.* pv. *incanae*. *X. campestris* is an important seed-borne pathogen. Seed lots with only one infected seed among 10 000 can lead to outbreaks and severe crop losses in the cultures (Schaad, 1980; Cook *et al.*, 1952). Seed assays to detect this pathogen are therefore routinely performed in many laboratories around the world. The detection method for *X. c.* pv. *campestris* (Roberts and Koenraad, 2006) was adopted by International Seed Testing Association (ISTA) and available on the ISTA website(<http://www.seedtest.org/en/content—1—>

¹INRA ANGERS, UMR Pathologie Végétale, 42 rue Georges Morel, B.P. 60057, 49071 Beaucouzé Cedex, France

²GEVES la Minière, 78285 Guyancourt, France

1132–241.html). This standard method is based on plating assays followed by pathogenicity tests of the suspected bacteria as the previous ones (Schaad, 1989; Schaad and Franken, 1996; Roberts and Koenraadt, 2002; Koenraadt *et al.*, 2005; Roberts and Koenraadt, 2006). They have been considered to be reliable and efficient methods for routine detection but also time-consuming and labour intensive techniques (Chitarra *et al.*, 2002; Tsygankova *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005 and 2006). Several authors developed valuable molecular methods to detect *X. campestris* based on the polymerase chain reaction (PCR) (Rijlaarsdam *et al.*, 2004; Tsygankova *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005) or real-time PCR (Berg *et al.*, 2006) with primers sets displaying various and useful specificity for pathogens of *X. campestris* (Fargier and Manceau, 2007). However, PCR assays are performed on small volumes of substrate and the sensitivity of PCR assays performed on direct DNA extracts is limited. Furthermore, DNA from dead cells can be amplified by PCR and non-infectious seed lots can be discarded after PCR-based seed analysis. Sensitivity can be further increased and bacterial viability can be checked with enrichment PCR techniques (BIO-PCR) (Schaad *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1998; Weller *et al.*, 2000). An other advantage of BIO-PCR on direct PCR is the elimination of putative inhibitors of the Taq-DNA polymerase present in environmental samples. BIO-PCR combines biological amplification on semiselective media (agar or liquid) with specific nucleic acid amplification by PCR. Several semi selective media, have been described and improved in order to detect *X. campestris* (Chang *et al.*, 1991; Randhawa and Schaad 1984; Schaad and Kendrick, 1975; Schaad 1989; Schaad and Franken 1996; Yuen *et al.*, 1987). They are rather complex, because they were set up for the selection of *X. campestris* among the saprophytic macroflora and for the recognition of *X. campestris* colonies on the agar surface. In the BIO-PCR scheme there is no need to make the medium suitable for typical morphology of *X. campestris* colonies.

In this paper we described a BIO-PCR protocol including a cheap, reliable

and well-adapted semi selective medium combined with a PCR amplification mix and protocol with primer sets specific to the targeted populations of *X. campestris*.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Bacterial strains

The bacterial strains used in this study were obtained from the Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), from Clause-Tézier laboratory, Angers, France and from Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes (LIPM), Toulouse, France (Table 5.1 and 5.2). All strains were routinely cultured on YPGA (yeast extract 7 g/L, peptone 7 g/L, glucose 7 g/L and agar 15 g/L) or YPA (yeast extract 7 g/L, peptone 7 g/L and agar 15 g/L) at 27°C. Cultures were stored in water at -20°C for short term conservation and freeze-dried for long term conservation.

5.2.2 Seed lots

Fifteen seedlots representing a selection of *Brassica* and *Raphanus* were obtained from SNES and a seed company (Table 5.3). They were selected to represent different growing conditions and geographical areas. The infestation level were previously made using the standard procedure (Roberts and Koenraad, 2002).

5.2.3 Seed washing

Sub-samples of seeds (10000 seeds) , were suspended in 100 ml of sterile distilled water in sterile 1-litre-conical flasks and shaken for 2.5 hours on an orbital shaker at 200 rpm.

5.2.4 Media

Solid semi-selective media mCS20ABN (Chang *et al.*, 1991) and mFSC (Schaad, 1989) were prepared according to Roberts and Koenraadt (2006). The other solid media used were: YPGAC (yeast extract 7 g/L, peptone 7 g/L, glucose 7 g/L, agar 15 g/L and cycloheximide 200 mg/l) or YPAC (yeast extract 7 g/L, peptone 7 g/L, agar 15 g/L and cycloheximide 200 mg/l) and YPACv when supplemented with (vancomycin, 0.5 mg/l and cephalixin 50 µg/ml). Additional culture broths were prepared for monitoring bacterial growth. Culture broths were made on the base of YPC (yeast extract 7 g/L, peptone 7 g/L, and cycloheximide 200 mg/l) supplemented with antibiotics: YPCb (bacitracin (100 mg/ml); YPCc (cefalexin 50 mg/l); YPCt (trimetroprim 30 mg/l); YPCn (neomycin sulphate 40 mg/l) and YPCv (vancomycin 0.5 mg/l).

5.2.5 Plant material and plant inoculations

Pathogenicity tests were performed on White cabbage cv. Bartolo (*Brassica oleracea* var. *capitata*) provided by Vilmorin SA (France). Plants were grown as described by Fargier and Manceau (2007). Inoculation methods were performed according to Koenraadt *et al.* (2005). Inoculum concentrations were assessed by plating 10-fold dilutions in sterile distilled water on YPGA medium and colony counting.

5.2.6 Susceptibility to antibiotics/ Antimicrobial agents

Antibiotics were obtained from the manufacturers in a chemically pure form. The antibiotics used were oxacillin, phosphomycin, colistin, bacitracin, streptomycin, rifampicin, gentamycin, kanamycin, cephalixin, novobiocin, vancomycin, trimethoprim, chloramphenicol, erythromycin, neomycin and cefalothin. Antibiotic stock solutions (2560 µg/ml of active ingredient) were made in sterile distilled water. Stock solutions were then filtered through

sterile 0.22- μm -pore-size polycarbonate filters.

YPGA plates containing antibiotics concentrations of 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and for bacitracin 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 mg/ml were prepared by pouring and mixing 19 ml of melted YPGA (50 °C) with 1ml of antibiotic solution in each Petri dish. Drops (3 μL) of bacterial suspensions (5×10^7 cfu/ml) were deposited onto the agar surface using a Steers replicator. Plates were incubated for 48 h at 27°C and examined for the presence of bacterial growth. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) were dermined at the lowest concentration that inhibit the bacterial growth.

5.2.7 Growth curves in semi selective broths

The experiments were performed in a Bioscreen C appartus (Manufacturer). The Bioscreen C is a computer-controlled shaker-incubator-reader. Customized microplates hold up to 200 individual 400 μl samples. All experiments were performed in triplicate. 315 μl of broth were inoculated with 35 μl of 1×10^8 cfu/ml of bacterial suspensions. The culture broths were incubated in the BioScreen C for five days at 27°C with extra intance constant agitation phase. The absorbance (OD) was measured at 600 nm every 2 hours during the experiment. The results were processed in the BioScreen C. Data were exported to a Microsoft Excel worksheet for analysis and were printed out as growth curves.

5.2.8 DNA preparation and PCR amplification

Bacterial strains were cultured in YPA at 27°C for 24h, and bacterial suspensions (10^7 cfu/ml) were made in sterile distilled water. DNA extractions were performed according to the method described by Llop *et al.* (1999). A set of primers defined in *tpiA* gene which codes for triosephosphate isomerise was added to the seven primer sets already described in the litterature (Ri-

jlaarsdam *et al.*, 2004; Tsygankova *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004 and Berg *et al.*, 2005, 2006. All amplifications were carried out in a final volume of 20 μl containing 1 X Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega), 200 μM of each dNTP (Promega), 400 nM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 1 unit of GoTaq[®] Flexi DNA polymerase (Promega) and 50 ng of genomic DNA. Reactions were performed according to the author's instructions (Tsygankova *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005 and 2006; Fargier and Manceau, 2007). For the tpiA8S/tpi8R primer set, the reactions were run for 35 cycles, each consisting of 30 s at 94°C, 30 s at 61°C, and 30 s at 72°C, with initial denaturation step of 5 min at 94°C and final extension of 5 min at 72°C. Amplification products were separated on a 1.5 % agarose gel in TBE, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light on a GelDoc 2000 (Bio-Rad).

Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays were carried out with sequence-specific primers pairs on a iCycler iQ system (BioRad) using intercalation of Sybr Green as fluorescent probe. The Sybr Green Kit (qPCR MasterMix Plus for SYBR[®] Green I with fluorescein, Eurogentec) was used for real-time monitoring of amplification. The optimisation of the real-time PCR reaction was performed according to the manufacturer's instructions (Eurogentec) but scaled down to 25 μl per reaction. The PCR conditions were standard (qPCR MasterMix Plus for SYBR[®] Green I with fluorescein reagent protocol) and all reagents were provided in the qPCR MasterMix Plus for SYBR[®] Green I with fluorescein reagent kit, including HotGoldStar DNA polymerase (Eurogentec). Results were evaluated by iCycler iQ Real Time Detection System software (BioRad).

5.2.9 Specificity and sensitivity of primers

Aliquots of 3 μl of ten-fold dilution series (from 1×10^8 to 10 cfu/ml) of bacterial suspensions (CFBP 1121) were used to determine the sensitivity threshold of PCR for all couple of primers in PCR experiments. The specificity

of the primer set tpiA8S (5'-CGTCAGTATCACCAGGAAAG-3') / tpiA8R (5'-CCAGATCGGCTCGTAGG-3') was evaluated versus all bacteria listed Table 5.1 and Table 5.2. A 216 bp long DNA fragment is amplified with this primer set with *X. campestris* strains.

5.2.10 BIO-PCR

To inoculate extract with *X. campestris* pv. *campestris*, a suspension of 10^6 cfu/ml of CFBP 1121 grown in YPA was diluted five times, in a ten-fold series. Healthy seed extract, 500 μ l was added to 4.5 ml of each *X. campestris* pv. *campestris* dilution. To determine the actual concentration of *X. campestris* pv. *campestris* contained each contaminated seed extract 100 μ l of each dilution was plated onto each three plate of YPACvc and incubated at 27°C. At each time, for BIO-PCR assay Aliquots (100 μ l) of each seed extracts were spread onto three plates of YPACvc media or in three tubes containing 4.5 ml of YPCvc broth. 100 μ l of the remaining of each contaminated seed extract were stored at -20°C for direct PCR. Inoculated media were incubated for various period of time 24 h, 36 h and 48 h at 27°C. Then, the culture plates were washed two times with 1.5 ml of sterile water and pooled. Aliquots (1ml) of either washing liquid or culture broth were used for DNA extraction and PCR amplification.

5.3 Results

5.3.1 Antibiotic susceptibility of *X. campestris*

The MIC of the 16 antibiotics tested are shown on Table 5.4.

Strains of all pathovars displayed quite the same susceptibility to various antibiotics tested. All strains were very susceptible to colistin, rifampicin and erythromycin (MIC<0.5 μ g/ml). They were susceptible to chloramphenicol (MIC = 1-8 μ g/ml) and to three aminosides (streptomycin, gentamycin,

5.3 Results

Strain number ^a	Other collections	Race ^b	Host	Isolation ^c	
				Year	Country
<i>X. c. pv. campestris</i>					
Xcc 147 ^d		4	<i>Brassica oleracea</i>		
CFBP 5814	Clause 563apcs	9	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Spain
CFBP 6650	LMG 8004, NCPPB 1145	9	<i>B. oleracea</i>	1958	UK
CFBP 5241 ^T	LMG 568, ATCC 33913	3	<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	1957	UK
CFBP 5820	Clause 2963	8	<i>B. oleracea</i>		
CFBP 5817	Clause 658pCS1	4	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2001	Chili
CFBP 5816	Clause 656C1FS1	1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Spain
CFBP 5818	Clause 751a2FS	1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2001	Spain
CFBP 3838	LMG 535, NCPPB 347	NP	<i>Iberis</i> sp.	1954	Tanzania
CFBP 1712		5	<i>B. oleracea</i> cv. <i>capitata</i>	1975	France
CFBP 1713		5	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1975	France
CFBP 5683		3	<i>B. oleracea</i>	1979	France
CFBP 1119		1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1967	France
CFBP 1869		1	<i>B. oleracea</i>	1976	Ivory Coast
CFBP 4952		1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>cortes</i>	1999	Belgium
CFBP 4953		7	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>cortes</i>	1999	Belgium
CFBP 5127	SNES 3316	1	<i>B. oleracea</i>	2000	
CFBP 5128	SNES 3330	1	<i>B. oleracea</i>	2000	
CFBP 5129	SNES 3429	1	<i>B. oleracea</i>	2000	
CFBP 5130	SNES 3430	7	<i>B. oleracea</i>	2000	
CFBP 5815	Clause 628a1cs	1	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	2000	Spain
CFBP 4954		6	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>aviso</i>	1999	Belgium
CFBP 4956		4	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>spacestar</i>	1999	Belgium
CFBP 1124		8	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1967	France
CFBP 1710		8	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1975	France
CFBP 1711		8	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1975	France
CFBP 6863	NCPPB 875	8	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	1958	Germany
CFBP 6865	NCPPB 2986	5	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	1975	Australia
CFBP 1121		1	<i>B. oleracea</i> cv. <i>bullata gemmifera</i>	1967	France
CFBP 4955		9	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> cv. <i>aviso</i>	1999	Belgium
<i>X. c. pv. incanae</i>					
CFBP 1371		NP	<i>Matthiola incana</i>	1972	France
CFBP 1438	NCPPB 1934	NP	<i>Matthiola incana</i>	1949	USA
CFBP 2527 ^{pt}	LMG 7490, NCPPB 937	NP	<i>Matthiola incana</i>	1950	USA
CFBP 5686	Shmit J. 10903	NP	<i>Matthiola incana</i>	1981	France
CFBP 1606		NP	Ornamental crucifers	1974	France
<i>X. c. pv. raphani</i>					
CFBP 5828	LMG 7505	R3	<i>Raphanus sativus</i>		USA
CFBP 5829	LMG 8134	R3	<i>R. sativus</i>		USA
CFBP 5827 ^{pt}	LMG 860, NCPPB 1946	R3	<i>R. sativus</i>	1940	USA
756C ^d	Kamdar <i>et al.</i> , 1993	R3	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (seed)		E. Asia
<i>X. campestris</i>					
CFBP 5825	LMG 547, NCPPB 983	NP	<i>Barbarea vulgaris</i>	1939	USA
CFBP 5826	LMG 7385	NP	<i>B. vulgaris</i>	1939	USA
CFBP 5824	LMG 7383, NCPPB 1930	NP	<i>Armoracia lapathifolia</i>	1939	USA

^a pt, pathotype strain; T, type strain.

^b NP, non pathogenic on differential cultivars; R for race of *X. c. pv. raphani*.

^c Year of isolation and country of origin given where known.

^d Bacterial strains provided by LIPM, Toulouse, France.

Table 5.1: Origin of *Xanthomonas campestris* strains used in this study

Chapitre 5. Détection des *X. campestris* dans les semences de Brassicacées

<i>Xanthomonas</i> strain	Strain number ^a	Other collections	Isolation ^b		
			Host	Year	Country
<i>X. albilineans</i>	CFBP 2523 ^T	LMG 494, NCPPB 2969	<i>Saccharum officinarum</i>	1961	Fiji
<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	CFBP 1846		<i>Corylus avellana</i>	1975	France
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	CFBP 2528 ^T	LMG 747, NCPPB 411	<i>Juglans regia</i>	1956	New Zealand
<i>X. arboricola</i> pv. <i>populi</i>	CFBP 3123 ^{pt}	LMG 12141	<i>Populus x canadensis</i>	1979	The Netherlands
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	CFBP 2535 ^{pt}	LMG 852, NCPPB 416	<i>Prunus salicina</i>	1953	New Zealand
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	CFBP 4924 ^T	LMG 538, NCPPB 457	<i>Axonopus scoparius</i>	1949	Colombia
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>alfalfae</i>	CFBP 3836 ^{pt}	LMG 497, NCPPB 2062	<i>Medicago sativa</i>		Sudan
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	CFBP 6107		<i>Allium fistulosum</i>	1998	Japan
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>	CFBP 3528		<i>Citrus limon</i>	1988	Argentina
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	CFBP 2524 ^{pt}	LMG 7303, NCPPB 1926	<i>Begonia</i> sp.	1962	New Zealand
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	CFBP 2866	NCPPB 3233	<i>Citrus aurantiifolia</i>	1982	Brazil
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	CFBP 3369	LMG 9322		1989	USA
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>	CFBP 3371 ^{pt}	LMG 9325		1989	
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	CFBP 1559		<i>Glycine hispida</i>	1974	France
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	CFBP 2526 ^{pt}	LMG 712, NCPPB 554	<i>Glycine hispida</i>	1956	Sudan
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	CFBP 2530 ^{pt}	LMG 761, NCPPB 633	<i>Gossypium hirsutum</i>	1958	Sudan
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	CFBP 2603	NCPPB 2443	<i>Manihot esculenta</i>	1972	Colombia
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP 1505		<i>Phaseolus vulgaris</i>	1967	Germany
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP 1815		<i>Phaseolus</i> sp.	1978	Greece
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP 1845		<i>Phaseolus</i> sp.	1978	Greece
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP 2534 ^{pt}	NCPPB 3035	<i>Phaseolus vulgaris</i>		USA
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP 412		<i>Phaseolus vulgaris</i>		USA
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP 4834		<i>Phaseolus vulgaris</i>	1998	France
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP 6165	LMG 826, NCPPB 381	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1957	Canada
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	CFBP 6167	LMG 7511	<i>Phaseolus</i> sp.	1954	USA
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP 1604		<i>Capsicum annuum</i>		Guadeloupe
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP 2484		<i>Lycopersicon esculentum</i>	1980	Guadeloupe
<i>X. bromi</i>	CFBP 3629		<i>Bromus sitchensis</i>	1993	France
<i>X. campestris</i> pv. <i>betae</i>	CFBP 5852	LMG 9040, NCPPB 2592	<i>Beta vulgaris</i>	1973	Brésil
<i>X. campestris</i> pv. <i>bilvae</i>	CFBP 3135	NCPPB 1759	<i>Feronia elephantacum</i>		India
<i>X. campestris</i> pv. <i>bilvae</i>	CFBP 3136 ^{pt}	NCPPB 3213	<i>Aegle marmelos</i>	1980	India
<i>X. cassavae</i>	CFBP 4642 ^T	LMG 673, NCPPB 101	<i>Manihot esculenta</i>	1951	Malawi
<i>X. codiae</i>	CFBP 4690 ^T	LMG 8678	<i>Codiaeum variegatum</i>	1987	USA
<i>X. cucurbitae</i>	CFBP 2542 ^T	LMG 690, NCPPB 2597	<i>Cucurbita maxima</i>	1968	New Zealand
<i>X. cynarae</i>	CFBP 4210		<i>Senebiera</i> sp.	1996	France
<i>X. fragariae</i>	CFBP 2157 ^T	LMG 708, NCPPB 1469	<i>Fragaria</i> sp.	1960	USA
<i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	CFBP 2533 ^{pt}	LMG 7314, NCPPB 2985	<i>Pelargonium peltatum</i>	1974	New-Zealand
<i>X. hortorum</i> pv. <i>taraxaci</i>	CFBP 410 ^{pt}	LMG 870, NCPPB 940	<i>Taraxacum kok-sahgyz</i>	1942	USA
<i>X. hyacinthi</i>	CFBP 1156 ^T	LMG 739, NCPPB 599	<i>Hyacinthus orientalis</i>	1958	The Netherlands
<i>X. melonis</i>	CFBP 4644 ^T	LMG 8670, NCPPB 3434	<i>Cucumis melo</i>	1974	Brazil
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	CFBP 2286 ^{pt}	LMG 797, NCPPB 1585	<i>Oryza sativa</i>	1964	
<i>X. pisi</i>	CFBP 4643 ^T	LMG 847, NCPPB 762	<i>Pisum sativum</i>	1957	Japan
<i>X. populi</i>	CFBP 1817 ^T	LMG 5743	<i>Populus x canadensis</i>	1957	France
<i>X. translucens</i> pv. <i>graminis</i>	CFBP 2053 ^{pt}	LMG 726, NCPPB 2700	<i>Dactylis glomerata</i>	1973	Switzerland
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i>	CFBP 2054 ^T	LMG 876, NCPPB 973	<i>Hordeum vulgare</i>	1933	USA
<i>X. vesicatoria</i>	CFBP 1545		<i>Lycopersicon esculentum</i>	1973	France
<i>X. vesicatoria</i>	CFBP 2537 ^T	LMG 911, NCPPB 422	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1955	New Zealand
<i>X. vesicatoria</i>	CFBP 2625			1986	Réunion

^a pt, pathotype strain; T, type strain.

^b Host of isolation, year of isolation and country of origin given where known.

Table 5.2: Other *Xanthomonas* strains used to check the specificity of the primer set tpiA8S/tpi8R.

5.3 Results

<i>Species/Varieties</i>	Seed lot reference batch	Xcc ^a contamination level	Sources
<i>B. oleracea</i>	I25g13-HC3A2	Healthy	FNPSP
<i>R. sativus</i>	E 8-075	Healthy	SNES - GEVES
<i>R. sativus</i>	E 8-076	Healthy	SNES - GEVES
<i>R. sativus</i>	E 8-078	Healthy	SNES - GEVES
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	E 8-081	Healthy	SNES - GEVES
<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	E 8-085	Healthy	SNES - GEVES
<i>B. oleracea</i>	E 8-107	Healthy	SNES - GEVES
<i>B. oleracea</i>	E 8-116	Healthy	SNES - GEVES
<i>B. oleracea</i>	E 8-120	Healthy	SNES - GEVES
<i>B. oleracea</i>	E 8-121	Healthy	SNES - GEVES
<i>B. oleracea</i>	ADAR 1	7.4×10^5 cfu/ml	FNPSP
<i>B. oleracea</i>	ADAR 2	6.3×10^5 cfu/ml	FNPSP
<i>B. oleracea</i>	ADAR 4	1.4×10^5 cfu/ml	FNPSP
<i>B. oleracea</i>	ADAR 5	Healthy	FNPSP
<i>B. oleracea</i>	ADAR 6	2×10^5 cfu/ml	FNPSP

^a *X. campestris* pv. *campestris*

Table 5.3: Seed lots used in this study

kanamycin) (MIC = 0.5-8 $\mu\text{g/ml}$) but less susceptible to neomycin ($8 < \text{MIC} < 32$ $\mu\text{g/ml}$). One strain *X. campestris* pv. *campestris* 147 was resistant to 128 $\mu\text{g/ml}$. It is a mutant obtained after selection on medium supplemented with 50 $\mu\text{g/ml}$ of streptomycin. The MIC of neomycin is inferior to 40 $\mu\text{g/ml}$ that is the concentration to be used in the mCS20ABN medium and probably make this medium too selective. The ranges of susceptibility of *X. campestris* to novobiocin, vancomycin, oxacillin and cefalotin were quite large: less than $0.5 < \text{MIC} = 32$, 4-128 $\mu\text{g/ml}$, 8-128 $\mu\text{g/ml}$ and 16-128 $\mu\text{g/ml}$, respectively. *X. campestris* is moderated susceptible to phosphomycin (MIC = 8-16 $\mu\text{g/ml}$). Finally, *X. campestris* showed a relative resistance to cephalixin and trimethoprim (CMI = 32 to more than 128 $\mu\text{g/ml}$).

Antibiotic	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$) of <i>X. campestris</i> species ^a			
	Xcc	Xci	Xcr	<i>X. campestris</i>
oxacillin	$\Delta 64 - 128$	$\Delta 32 - 128$	$\Delta 8 - 128$	$\Delta 8 - 64$
phosphomycin	$\Delta 8 - 16$	16	16	$\Delta 8 - 16$
colistin	$< 0,5$	$< 0,5$	$< 0,5$	$< 0,5$
bacitracin (mg/ml)	$\Delta 16 - > 128$	$\Delta 32 - 64$	$\Delta 16 - > 128$	$\Delta 64 - > 128$
streptomycin	$\Delta < 0,5 - 128$	$\Delta 2 - 4$	4	$\Delta < 0,5 - 4$
rifampicin	$< 0,5$	$< 0,5$	$< 0,5$	$< 0,5$
gentamycin	$\Delta 1 - 8$	4	$\Delta 4 - 8$	$\Delta < 0,5 - 8$
kanamycin	$\Delta < 0,5 - 4$	4	4	$\Delta < 0,5 - 1$
cephalexin	$64 - > 128$	> 128	$64 - > 128$	128
novobiocin	$\Delta < 0,5 - 32$	$\Delta 1 - 8$	2	$\Delta < 0,5 - 1$
vancomycin	$\Delta 16 - 128$	$\Delta 16 - 32$	$\Delta 4 - > 64$	$\Delta 16 - 32$
trimethoprim	$\Delta 32 - > 128$	≥ 128	$\Delta 32 - > 128$	≥ 128
chloramphenicol	$\Delta 1 - 8$	$\Delta 2 - 4$	$\Delta 2 - 8$	$\Delta 1 - 8$
erythromycin	$\Delta < 0,5 - 1$	$\Delta < 0,5 - 1$	$\Delta < 0,5 - 1$	$\Delta < 0,5 - 1$
neomycin	$\Delta 16 - 32$	32	32	$\Delta 8 - 32$
cefalothin	$\Delta 64 - > 128$	$\Delta 32 - 64$	$\Delta 16 - > 128$	64

^a Δ ; for variable MIC between many value.

Table 5.4: Minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics for *X. campestris*.

5.3.2 Bacterial growth assessment in antibiotic supplemented broths.

YPC broths supplemented with bacitracin (100mg/ml), cefalexin (50 μ g/ml), trimetoprim (30 μ g/ml), neomycin (40 μ g/ml), and vancomycin (500 μ g/ml), respectively, and mFSC broth and mCS20ABN were used in order to test their effects on the growth of *X. c. pv. campestris* CFBP 1121 and of the saprophytic microflora of various seedlots. No growth was observed in mFSC broth, mCS20ABN broth and YPC supplemented with neomycin when they were inoculated with *X. c. pv. campestris* CFBP 1121 and with saprophytic bacteria. The strain CFBP 1121 grew more slowly in YPC supplemented with 100 mg/ml of bacitracin and the ODs observed in wells inoculated with saprophytic microflora isolated from seeds were similar to the OD observed in YPC broth (data not shown). The saprophytic microflora was a little bit inhibited in YPC supplemented with Cefalexin and trimetoprim. YPC supplemented with vancomycin inhibited entirely the growth of saprophytic microflora isolated from the two seedlots. The strain CFBP 1121 grew in these broths as well as in YPC medium (Figure 5.1).

5.3.3 Comparative efficiency of semi selective media proposed to detect *X. campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds

YPCA media supplemented with combinations of antibiotics that were selected after MIC and growth test in broth (cefalexin, trimetoprim and vancomycin) were compared to the two semi-selective media mCS20ABN and mFS versus a collection of the 49 strains of *X. campestris*. The mCS20ABN inhibited 15 *X. campestris* strains (14 strains of *X. c. pv. campestris* and 1 strain of *X. c. pv. incanae*). The growth of the rest of strains was very slow and we waited more than five days to detect the growth. YPACvt (vancomycin, 500 μ g/ml + trimetoprim, 30 μ g/ml) and YPACtc (trimetoprim,

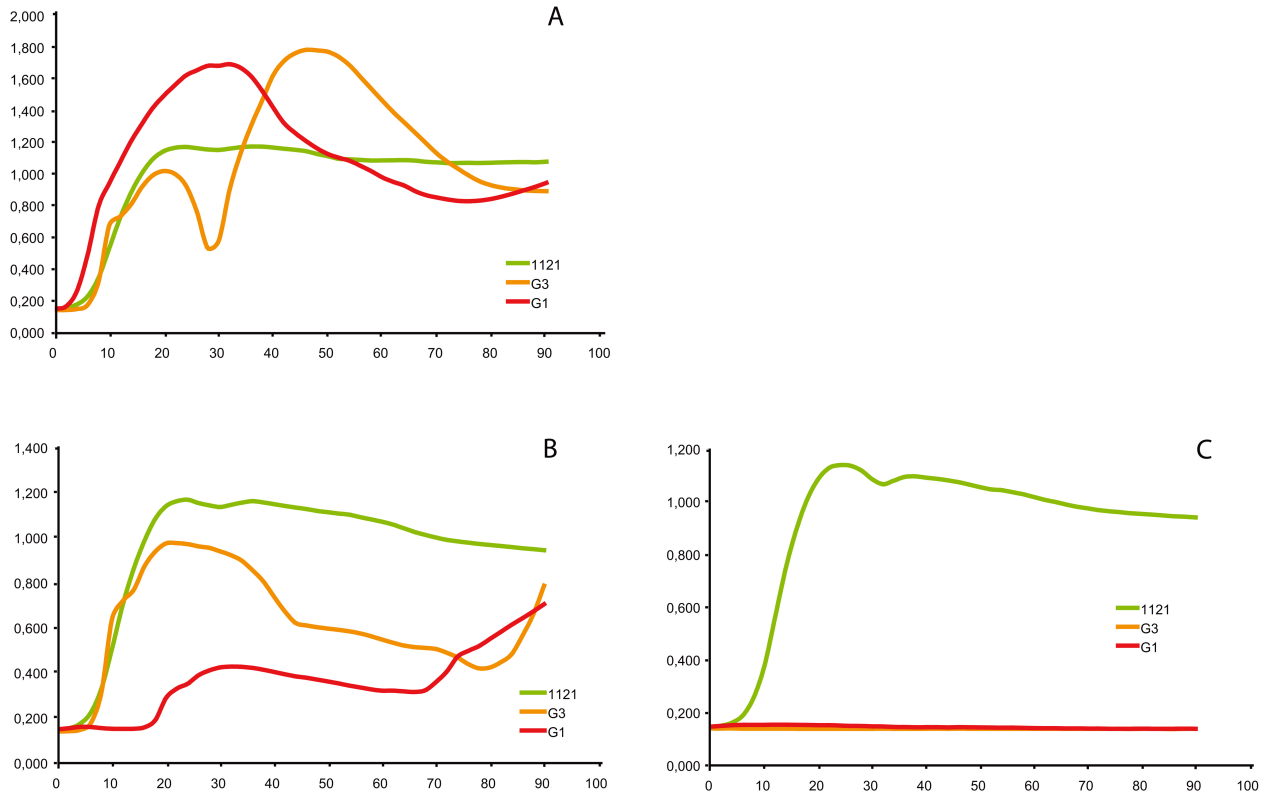


Figure 5.1: Growth curves of *X. c. pv. campestris* and saprophyte bacteria performed in a Bioscreen at 27°C during five days, (A) on YPC broth without antibiotic, (B) on YPC broth with cefalexin and (C) on YPC broth with vancomycin.

Y-axis represent absorbance measures (A.U.), X-axis represent the incubation time (h).

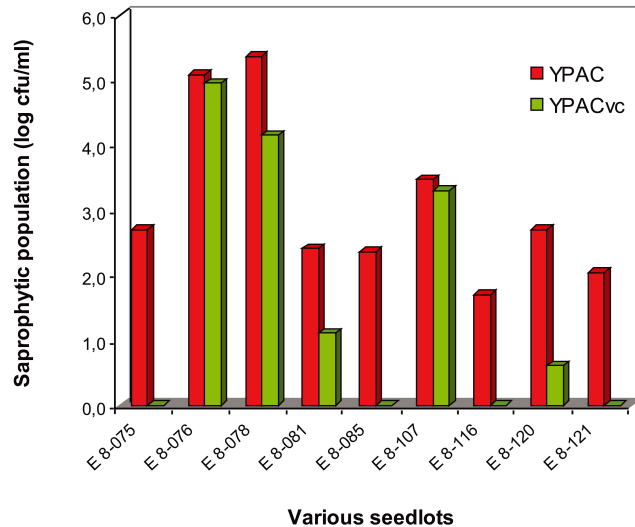


Figure 5.2: Evaluation of growth inhibition of the saprophyte on YPACvc compared to a non selective media (YPGA)

30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + cephalixin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inhibited 4 strains of *X. campestris* (2 strains of *X. c. pv. campestris*, 1 strain of *X. c. pv. incanae* and 1 strain of *X. c. pv. raphani*. All *X. campestris* strains grew on mFS and YPACvc (vancomycin, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + cephalixin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) as well (data not shown).

5.3.4 Selectivity of the YPACvc medium for the crucifer seed microflora

The saprophytic microflora were isolated from 9 *X. campestris*-free seedlots after seed soaking and diluted and plated onto YPAC and YPACvc media. The growth of saprophytic microflora was inhibited for all seed samples on YPACvc in comparison with YPAC. However, the inhibition level is variable according to the samples (Figure 5.2) because the composition of seed microflora is probably different in each seedlots and certain components of seed microflora are still resistant to vancomycin and cephalixin.

Bacterial concentration	genes and primers					
	<i>tpiA</i>	<i>hrpF</i>				XCC2585
	<i>tpiA8S/8R</i> ^a	<i>XCF/XCR</i> ^b	<i>DLH 120/125</i> ^c	<i>DLH 151/152</i> ^d	<i>DLH 153/154</i> ^d	<i>Zup2309/2310</i> ^e
108 cfu/ml	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
107 cfu/ml	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
106 cfu/ml	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
105 cfu/ml	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
104 cfu/ml	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	1/3
103 cfu/ml	2/3	0/3	0/3	2/3	2/3	0/3
102 cfu/ml	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

^a this study; ^b Park *et al.*, 2004; ^c Berg *et al.*, 2005; ^d Berg *et al.*, 2006; ^e Rijlaarsdam *et al.*, 2004.

Table 5.5: Sensitivity assessment of primers used in this study.

5.3.5 Specificity and detection limits of primers

All tested primers tested were specific to *X. campestris* except the primer set DLH 109/112 (Berg *et al.*, 2005) which amplified a DNA fragment with eight other strains (*X. hortorum* pv. *taraxaci*, CFBP 410; *X. arboricola* pv. *juglandis* CFBP 2528; *X. vesicatoria* CFBP 1545, CFBP 2537, CFBP 2625; *X. cynarae* CFBP 4210; *X. codei* CFBP 4690; and *X. populi* CFBP 1817). The sensitivity of PCR varied according to the sets of primers used in the PCR reaction mix (Table 5.5). Three sets of primers (*tpiA8S/8R*, DLH 151/152 and DLH 153/154) displayed the best sensitivity. An amplification was observed in all assays performed with a bacterial suspension with a estimated concentration equal to 1×10^4 cfu/ml (10 cells per PCR reaction) and an amplification was observed in 2 out 3 assays with a estimated concentration equal to 1×10^3 cfu/ml (1 cells per PCR reaction). The probability to pipet a volume without DNA target is superior to the probability to the PCR to be inhibited in this last situation. So, we conclude that these two primers sets give all the potential yield of the reaction.

5.3.6 Assessment of YPCvc broth and YPACvc medium as enrichment medium used in the scheme of a BIO-PCR assay

A seed extract was prepared with a *X. campestris* free seedlot and inoculated with a suspension of *X. c. pv. campestris* CFBP1121 (1×10^6 cfu/ml). A 10-fold dilution serie was prepared in seed extract down to 10 cfu/ml. 100 μ l of 10-fold dilution series were used to inoculate either 4.5ml of YPCvc broth or the surface of YPACvc medium. The enrichment broth and plates were incubated at 27°C for various priods of time (24 h, 36 h and 48 h). After DNA extraction (Llop *et al.*, 1999), the amount of DNA target after enrichment was assessed by real-time PCR. The bacteria were detected after 36 h and 48 h of incubation at 27 °C (Table 5.6). The growth of bacteria was to slow to detect bacteria after 24 h in both enrichment media. The best results were obtained after 36 h. Competition within the microflora growing in the broth and on the agar surface was unfavourable to *X. c. pv. campestris* after 48 h. *X. c. pv. campestris* grew significantly well on YPACvc agar surface than in YPCvc broth. We have chosen to grow the seed extract on YPACvc agar surface for 36 h for the further BIO-PCR assays.

5.3.7 Comparison between reference method (Roberts and Koenraad, 2006) and the YPACvc / BIO-PCR method for the detection of *X. campestris pv. campestris* in naturally infected crucifer seeds

We compared the reference detection method according to Roberts and Koenraad (2006), and the BIO-PCR on the YPACvc solid media with 36 hours of biological amplification followed by DNA extraction and amplification by PCR using tpiA8S/tpiA8R primers sets. The results were shown on table 5.7. Standard detection method failed some times to detected *X. campestris*

concentration in seed extract Cfu/ml	Incubation time					
	24 h		36 h		48 h	
	YPCvc broth	YPACvc agar	YPCvc broth	YPACvc agar	YPCvc broth	YPACvc agar
1×10^3 cfu/ml	— ^a	—	2.57×10^2 ^b (39,5) ^c	2.09×10^6 (24,3)	3.80×10^2 (38,9)	4.26×10^5 (27)
1×10^2 cfu/ml	—	—	—	6.16×10^6 (22,5)	—	4.84×10^4 (30,7)
1×10^1 cfu/ml	—	—	—	2.09×10^4 (32,1)	—	—
healthy seed extract	—	—	—	—	—	—

^a —, no fluorescence.

^b Bacterial concentration in cfu/ml assessed with the regression curve $y = -3.8946x + 48.956$ calculated with known concentration of bacterial suspensions in seed extract.

^c Ct values.

Table 5.6: Enrichment of *X. c. pv. campestris* cells by incubation for increasing times in YPCvc broth and on YPACvc agar assessed by real-time PCR.

pv. campestris when the seed extract were few contaminated but BIO-PCR detected *X. campestris pv. campestris* in all contaminated seed lot and and the dilution of the seed extract.

5.4 Discussion

The semi selective media developed so far (mCS20ABN, mFS and NSCAA) were set up in the aim of being capable of a visual detection putative colonies of the pathogen on agar plate combined with inhibition of the saprophytic microflora. Thereafter, the suspected bacteria were inoculated onto plants in order to confirm their pathogenicity and their identity (Schaad and Kendrick,1975; Randhawa and Schaad, 1984; Yuen *et al.*, 1987; Schaad, 1989; Chang *et al.*, 1991; Schaad and Franken, 1996; Koenraad *et al.*, 2005; Roberts and Koenraad, 2006). The starch has been incorporated into these media in order to used the amyolytic activity as a first screen to select suspected colonies. This step is nomore requested in the scheme of BIO-PCR assay because the specific detection of *X. campestris* cells is made on the mixed bacterial suspension after washing the agar surface.

5.4 Discussion

Seed lot ^a	Standard detection method (Roberts and Koenraad, 2006)		
	Xcc (Cfu) ^b	Pathogenicity assay ^c	BIO-PCR ^d
ADAR 1.0	TMC	+	
ADAR 1.1	4900	+	
ADAR 1.2	350	+	
ADAR 1.3	20	+	
ADAR 2.0	TMC		+
ADAR 2.1	600		+
ADAR 2.2	30		+
ADAR 2.3	1	+	+
ADAR 4.0	1350	+	+
ADAR 4.1	115	+	+
ADAR 4.2	27	+	+
ADAR 4.3	0		
ADAR 5.0	0		-
ADAR 6.0	0		-
ADAR 6.1	0		-
ADAR 6.2	0		-

^a Ten fold dilutions of the contaminated seed extracts ADAR 1.0, ADAR 2.0, ADAR 4.0 and ADAR 6.0 were made in the not contaminated seed lot I25g13-HC3A2 produce the other ranged seed lots.

^b TMC, to much to count.

^c +, disease symptoms

^d Result recorded as + succesfull amplification of the DNA target and - for noamplification.

Table 5.7: Comparison between standard detection method (Roberts and Koenraad, 2006) and BIO-PCR.

The determination of the antibiotic susceptibility of *X. campestris* strains indicated that the concentrations of antibiotics used in mCS20ABN were too high and some strains of *X. campestris* did not grow on media containing these amount of antibiotics. The neomycin concentration added in the semi-selective media mCS20ABN (40 mg/l) and recommended by ISTA (Roberts and Koenraadt, 2006), is higher than the MIC in a medium at pH 7. It is true that the neomycin is inactivated when the pH decrease and *X. campestris* forms colonies on media that contain 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of neomycin at pH 6 as recommended by Roberts and Koenraadt, (2006). However, the pH sensitivity is a source of potential errors in the selectivity of the medium. On the opposite cephalixin and vancomycin, already used in other semi selective media in mFS and NSCAA respectively (Schaad, 1989; Randhawa and Schaad, 1984) were not active on all *X. campestris* strains at the recommended concentration and inhibited a large part of the saprophytic bacterial microflora of crucifers seeds. We propose the YPACvc medium as an enrichment medium prior PCR because all *X. campestris* strains grow well on this medium and the growth of a important part of the saprophytic microflora is inhibited. Furthermore this medium is easy to made and cheaper than mCS20ABN, mFS and NSCAA media.

Schaad *et al.* (1995) developed a new method for the detection of bacteria in seed: the BIO-PCR that has been well adapted to aerobic bacteria such as *Xanthomonas* Seven couples of primers specific to *X. campestris* or *X. c. pv. campestris* were designed either from the genomic sequence of the *hrpF* gene (Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005 and 2006) coding the protein that formed the translocon of Xanthomonads type III secretion system (Rossier *et al.*, 2000; Szurek *et al.*, 2002) or from random selected fragments of DNA obtained after rep-PCR analysis (Tsygankova *et al.*, 2004) and AFLP analysis (Rijlaarsdam *et al.*, 2004). Recently we show that primer defined by Tsygankova *et al.*, (2004), Park *et al.*, (2004) and Berg *et al.*, (2005) were good tools for the rapid identification of the *X. campestris* species (Fargier

and Manceau, 2007). We also reported that the two other sets of primers designed by Rijlaarsdam *et al.* (2004) displayed a narrow range of detection. They do not amplified any DNA fragment from the strain of *X. c. pv. incanae* pathogenic only on *Cheiranthus cheiri*, all *X. c. pv. raphani* strains and the non pathogenic strains of *X. campestris* and therefore provide helpful scheme for the rapid identification of pathovars in *X. campestris* when used in combination with other primers (Fargier and Manceau, 2007). We obtained good output with the two new sets of primer designed by Berg *et al.*, (2006) but the primers must be used in combination with a internal probe to be specific to *X. campestris* (Berg *et al.*, 2006). We found that the primer set tpiA8S/8R was reliable in direct PCR or real time PCR as well. Using YPACvc as the solid medium and primer set tpiA8S/8R provided a reliable BIO-PCR protocol that greatly improve the detection of *X. campestris*. The primer set tpiA8S/8R can be used in a classic PCR combined to agarose gel electrophoresis and SYBR green I real time PCR as well.

Acknowledgements

This work was supported by INRA, GEVES and the “Programme semence” founded by the Région Pays de la Loire, the Conseil General du Maine-et-Loire and Angers Loire Métropole. E. Fargier was supported by a grant from GEVES, France. We thank LIPM, Toulouse, France and Clauze Tezier, Angers, France for supplying some strains.

Données complémentaires

Évaluation de la durée de vie de cellules mortes dans du macérat de graine de chou

La PCR utilise l'ADN comme substrat d'amplification. Il a été démontré que l'ADN pouvait être très stable dans certains milieux et donc ne pas traduire la présence d'organismes vivants dans le milieu étudié. Ainsi, l'obtention d'un signal positif d'amplification après BIO-PCR pourrait être dû à une amplification de fragments d'ADN de cellules bactériennes mortes dans le lot de semences. Une expérience a été réalisée au laboratoire afin d'évaluer le temps de dégradation de l'ADN de cellule morte dans du macérat de graine de chou. Pour cela, nous avons préparé deux suspensions bactériennes à 10^8 ufc/ml, l'une des deux ayant été placée 10 min à 100°C . Un macérat de graines de chou a été préparé en parallèle et 0,5 ml ont été déposés dans 10 tubes contenant 4,5 ml de milieu nutritif LP (Levure Peptone). 100 μl de suspensions bactériennes vivantes ou mortes ont été ajoutés aux tubes contenant le macérat et le milieu. Ces tubes ont été placés dans une étuve à 27°C pendant 18, 24, 48 et 72 heures. À T 0, T 18, T 24, T 48 et T 72 heures, 1 ml de chacune de ces suspensions a été prélevé puis centrifugé 5 min à 13200 rpm. Les ADN ont été extraits, puis une amplification d'ADN a été réalisée en suivant les protocoles décrits dans l'article précédent, en utilisant les amorces tpiA8S/tpiA8R. Les résultats sont reportés dans la figure 5.3. Alors que les valeurs de Ct des bactéries vivantes diminuent, traduisant une croissance de population au cours du temps, les valeurs de Ct des bactéries mortes augmentent pour être équivalentes à celles mesurées dans le macérat sain. Le macérat est un milieu biologique actif et l'ADN des cellules mortes y est rapidement hydrolysé. La PCR peut donc être utilisée pour rendre compte de la viabilité des bactéries si elle est effectuée après une incubation dans le macérat.

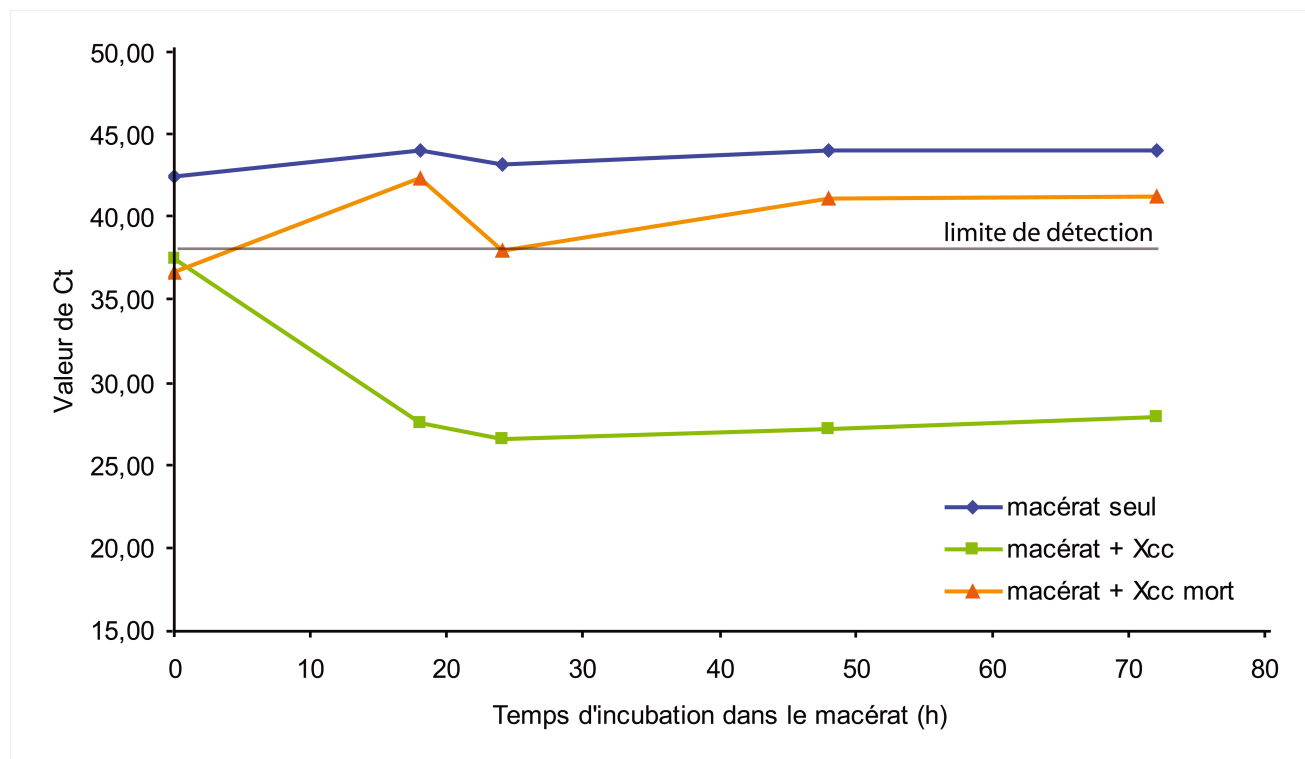


FIG. 5.3 – Mesure de la durée de vie des cellules mortes dans du macérat de graines de chou. Les valeurs de Ct ont été obtenues après une amplification par PCR en temps réel, d'une suspension de macérat sain, d'une suspension de macérat contenant 10^8 ufc/ml de *X. c. pv. campestris* vivants (Xcc) et d'une suspension de macérat contenant 10^8 ufc/ml de *X. c. pv. campestris* morts correspondant à différents temps d'incubation dans le macérat.

Mise au point d'une nouvelle technique d'enrichissement des bactéries dans les semences : La SEED-PCR

Ces travaux ont débuté à partir d'un constat simple : suite à la germination de graines de Brassicacées contaminées, la population bactérienne avait augmenté (Laâla, 2004). Nous nous sommes intéressés à utiliser ce processus naturel de multiplication des cellules de *X. campestris* lors de la germination comme technique d'enrichissement bactérien. Nous avons combiné cette étape à une amplification par PCR d'un fragment d'ADN cible spécifique de l'espèce *X. campestris*, et nous avons nommé cette méthode la SEED-PCR.

Nous avons à notre disposition huit petits lots de 20 graines contaminées avec 100 μ l d'une suspension bactérienne de concentration variable allant de 10 à 10⁸ ufc/ml ainsi qu'un lot sain. Nous avons mis à germer ces 9 lots de graines dans des boîtes de Petri contenant du papier filtre imbibé de 2 ml d'eau. Le tout a été placé dans une étuve à 27°C pendant 72 h. Les graines germées ont ensuite été lavées avec 3 ml d'eau, et 1 ml de cette eau de lavage a été récupéré dans un micro-tube pour extraire l'ADN, et pour procéder à l'amplification par PCR. Ces deux étapes suivent en tout point les protocoles d'extraction des ADN et d'amplification par PCR décrit dans l'article précédent. Nous avons également utilisé le couple d'amorces tpiA8S/tpiA8R défini dans cet article.

Cette technique a été réalisée en parallèle à la BIO-PCR. La figure 5.4 montre l'efficacité de la SEED-PCR comparée à la BIO-PCR. Ces deux techniques sont d'efficacité équivalente, et permettent toutes deux de détecter jusqu'à 10 ufc/ml de macérat. La SEED-PCR a l'avantage d'être peu onéreuse, et de ne nécessiter aucune préparation. Actuellement cette technique est en cours d'évaluation sur un plus grand nombre de graines ainsi que sur des lots de semences naturellement contaminées. Notre objectif est de proposer un protocole de SEED-PCR optimisé qui simplifierait la procédure de détection. Nous envisageons également de fournir un complexe d'amorces pour la détection des pathovars. Nous avons vu dans les chapitres 3 et 5, qu'aucun des couples

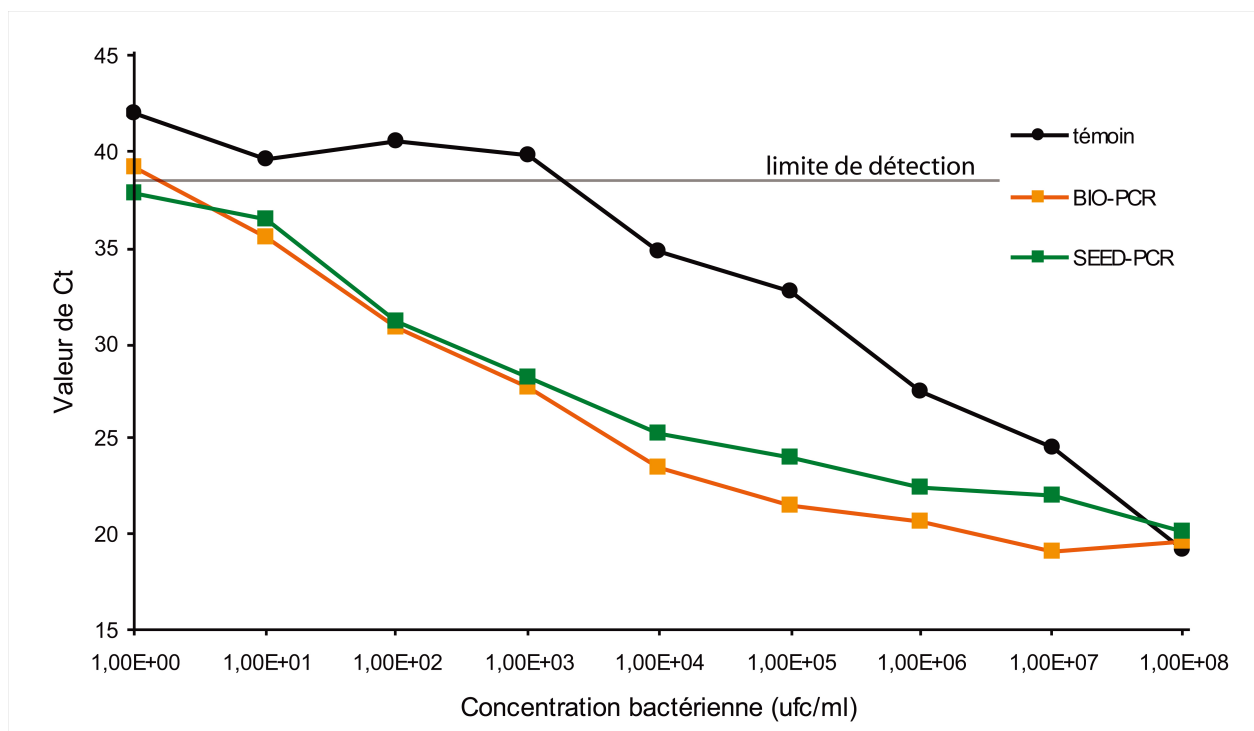


FIG. 5.4 – Comparaison de deux méthodes d'enrichissement bactérien : la BIO-PCR et la SEED-PCR. Les valeurs de Ct ont été obtenues après une amplification par PCR en temps réel, d'une suspension bactérienne calibrée (témoin) et de suspensions bactériennes obtenues après un enrichissement bactérien par BIO-PCR et SEED-PCR. Les valeurs en abscisse correspondent à la concentration bactérienne de la suspension témoin, au niveau de contamination initiale des graines 72 h avant un enrichissement par SEED-PCR et au niveau de contamination initiale du macérat 36 h avant un enrichissement par BIO-PCR. La différence entre les valeurs de Ct témoin et les valeurs de Ct SEED-PCR et BIO-PCR traduit la multiplication des bactéries pendant l'incubation.

d'amorces étudiés ne pouvait être considéré comme pathovar spécifique. Cependant, combinés, ils peuvent servir à l'identification rapide des pathovars. En effet les couples d'amorces définis par Rijlaarsdam *et al.*, 2004, ne sont pas seulement spécifiques des *X. c. pv. campestris*, mais détectent également les souches *X. c. pv. incanae* pathogène sur les *Matthiola* sp. En revanche, ils ne détectent pas les souches *X. c. pv. incanae* pathogènes sur les *Cheiranthus* sp. ni les *X. c. pv. raphani*, et aucun *X. campestris* non pathogène. Au cours du chapitre 4, nous avons montré que les *X. c. pv. incanae* partageaient l'allèle *dnaK* 8 et que les *X. campestris* non pathogènes partageaient l'allèle *rpoD* 8, nous proposons de rechercher de nouvelles amorces dans ces deux allèles spécifiques respectivement des *X. c. pv. incanae* et *X. campestris* non pathogènes pour offrir un complexe d'amorces permettant d'identifier les pathovars comme suit :

	<i>X. c. pv. campestris</i>	<i>X. c. pv. raphani</i>	<i>X. c. pv. incanae</i> (<i>Matthiola</i> sp.)	<i>X. c. pv. incanae</i> (<i>Cheiranthus</i> sp.)	<i>X. campestris</i> opportunistes
tpiA8S/tpiA8R	+	+	+	+	+
Zup2309/2310	+	-	+	-	-
<i>dnaK</i> 8	-	-	+	+	-
<i>rpoD</i> 8	-	-	-	-	+

^a (Rijlaarsdam *et al.*, 2004)

Conclusions générales et perspectives

L'objectif de ce travail était de réviser la taxonomie des *X. campestris*. Il nous fallait tout d'abord éclaircir la classification de l'espèce par une approche phylogénétique et par une étude du pouvoir pathogène des souches, puis proposer une nouvelle nomenclature si nécessaire, et enfin offrir un nouvel outil de détection des pathogènes vivants dans les semences de Brassicacées. Les résultats obtenus durant nos recherches contribuent significativement à l'amélioration de la taxonomie de l'espèce *X. campestris*, participent à la mise en place d'une nouvelle stratégie pour définir les espèces bactériennes et proposent de nouveaux outils de détection de l'agent pathogène dans les semences.

La MLSA comme nouvelle stratégie de définition de l'espèce bactérienne

Notre travail montre que la MLSA permet de différencier des groupes de bactéries qui correspondent aux espèces déterminées par les hybridations ADN-ADN. La MLSA se présente donc comme une alternative intéressante à cette technique.

Suivant les différentes espèces dont nous disposions, nous avons identifié sur l'arbre phylogénétique — obtenu à partir des données concaténées de séquences partielles des gènes *atpD*, *dnaK*, *efP* et *gyrB* — les différentes espèces définies par des hybridations ADN-ADN (Vauterin *et al.* 1995) et par rep-PCR (Rademaker *et al.*, 2005).

Nous avons également pu confirmer que les nouvelles espèces *X. euvesicatoria* proposées par Jones *et al.* (2004) et *X. alfalfae*, *X. citri* et *X. fuscans*

proposées par Schaad *et al.*, 2005) constituaient des taxons identifiés par des bootstraps significatifs.

Notre étude MLSA a non seulement permis d'identifier tous les groupes de l'espèce *X. axonopodis* définis par Rademaker *et al.* (2005), mais a également permis de clarifier la position taxonomique de certains de ces pathovars par rapport aux nouvelles espèces proposées par Jones *et al.* (2004) et (Schaad *et al.*, 2005). *X. axonopodis* pv. *allii* et *X. axonopodis* pv. *betae* se placent au sein de l'espèce *X. alfalfae*, *X. axonopodis* pv. *glycines* et *X. axonopodis* pv. *bilvae* se placent dans l'espèce *X. citri*. L'un des deux groupes de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* non fuscans est regroupé dans l'espèce *X. fuscans*.

Nous pourrions proposer deux nouvelles espèces *X. phaseoli* regroupant le second groupe de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. axonopodis* pv. *manihotis*, et l'espèce *X. begoniae* qui regroupe les souches de *X. axonopodis* pv. *begoniae* identifiées dans le groupe 9.1 de Rademaker *et al.* (2005).

L'un des problèmes auquel nous devons faire face sera de décider quel est le niveau de coupure pour délimiter au mieux les espèces. Il est évident que les souches que nous allons ajouter à l'étude nous permettront d'affiner nos résultats. Néanmoins nous ignorons si elles seront suffisantes pour nous permettre de faire un choix pour délimiter le plus finement possible de nouvelles espèces. Une analyse MLST au niveau de ces groupes devrait nous renseigner sur les niveaux d'échanges génétiques entre les individus. Ce critère nous permettra de définir le niveau de coupure représentatif d'un certain isolement génétique et donc d'une spéciation.

L'incongruence entre pathogénie et espèces bactériennes est confirmée. Vauterin *et al.*, 1995 ont du également faire face à ce genre de problèmes; les hybridations ADN-ADN ont regroupé des pathogènes qui ne semblaient pas partager des caractères pathologiques communs comme par exemple les pathovars *pelargonii* (isolé de *Pelargonium* et de *Geranium*), *vitians* (isolé de *Lactuca* spp) et *hederae* (isolé de *Hedera helix*). Ce sont des pathogènes associés à des hôtes et des maladies différentes mais qui, suivant les résultats

d'hybridations ADN-ADN, forment la nouvelle espèce *X. hortorum* (Vauterin *et al.*, 1995). Vauterin *et al.*, (1995) précisent que de telles associations pouvaient être envisagées. La proximité des pathovars *vitians* and *hederae* a été identifiée par l'analyse électrophorétique des protéines (Vauterin *et al.*, 1991) celle des pathovars *pelargonii* et *hederae* a été révélée par leur profil d'acide gras (Yang *et al.*, 1993). Ainsi déterminer la localisation des coupures délimitant les nouvelles espèces devra être fait en accord avec les données que nous pourrons obtenir sur les différents pathovars.

À l'inverse le pathovar *phaseoli* forme des groupes dans des espèces distinctes. Cette observation confirme des résultats obtenus précédemment par AFLP (Manceau and Brin, 2003) et par rep-PCR (Rademaker *et al.*, 2005). Pourrait-on prédire leurs différences? Ces deux groupes ont-ils également des différences dans leur spécificité d'hôte pouvant expliquer leur divergence? Une thèse est actuellement en cours au sein de l'UMR PaVé qui tente de définir les relations entre la phylogénie et l'adaptation à une plante hôte. La spécificité d'hôte chez les *Xanthomonas* n'est pas congruente avec la phylogénie. L'adaptation à une plante hôte pourrait donc être le résultat d'une évolution récente, acquit par des transferts de gènes horizontaux.

La taxonomie de l'espèce *X. campestris*

Nous avons confirmé par MLSA que l'espèce *X. campestris* forme une espèce phylogénétique telle que l'ont décrit Vauterin *et al.* (1995) et Rademaker *et al.* (2005). Les membres de cette espèce partagent une communauté d'hôtes : les Brassicacées (Bradbury, 1986). Pour cette espèce il existe une congruence entre les plantes hôtes et l'entité phylogénétique correspondant à la notion d'écotype définie par Cohan (2001).

Notre étude sur le pouvoir pathogène des individus appartenant à l'espèces *X. campestris* (Vauterin *et al.*, 1995) met en évidence l'existence de trois variants, aussi bien dans leur gamme d'hôtes que sur le type de symptômes qu'ils induisent. La nervation noire est provoquée par *X. campestris*

pv. *campestris*, la maladie des taches foliaires est engendrée par *X. c. pv. raphani*, et enfin la maladie du dépérissement des giroflées induite par *X. c. pv. incanae*. Ainsi nous confirmons définitivement les doutes sur les synonymies au niveau du pouvoir pathogène entre le pathovars *campestris* et le pathovars *aberrans*, et entre le pathovars *raphani* et le pathovars *armoraciae*. Nous ne soutenons plus l'existence de maladies supplémentaires autres que la nervation noire, la maladie des taches foliaires et la maladie du dépérissement des giroflées. Des études complémentaires révèlent que les pathovars *campestris* et *incanae* diffèrent du pathovar *raphani* par les voies d'entrées qu'ils utilisent pour infecter leurs plantes hôtes. Les pathovars *campestris* et *incanae* sont des pathogènes vasculaires qui colonisent préférentiellement la plante au travers des hydathodes (Kendrick and Baker, 1942; William, 1980; Hugouvieux *et al.*, 1998). À l'inverse, le pathovar *raphani* pénètre dans la plante par les stomates et cause une maladie dans le parenchyme (McCulloch, 1929; White, 1930; Hugouvieux *et al.*, 1998). Le pathovar *campestris* peut également pénétrer par les stomates provoquant de petites taches noires précédant le développement de la nervation noire (Alvarez *et al.*, 1994). Nous avons également observé ce type de symptôme lorsque nous inoculions les bactéries par pulvérisations. Au niveau de sa spécificité d'hôtes, nous avons montré que le pathovar *raphani* a une plus large gamme d'hôtes, incluant des plantes de la famille des Brassicaceae et des Solanaceae; il partage une partie de ces hôtes, à savoir : les Brassicaceae, avec les pathovars *campestris* et *incanae*. Le pathovar *campestris* est pathogène sur des plantes appartenant à un de ces genres : *Brassica* sp., *Raphanus* sp. *Barbarea* sp. et/ou *Iberis* sp., alors que le pathovars *incanae* est pathogène sur les plantes appartenant aux genres *Matthiola* sp. ou *Cheiranthus* sp. Il existe également au sein de l'espèce *X. campestris* des souches pour lesquelles nous n'avons pu déterminer d'hôtes sensibles. Ces souches ont néanmoins été isolées de Brassicacées.

Une très grande diversité a été observée entre et au sein de chacun des pathovars de cette espèce. Toutes les souches responsables de la nervation

noire se sont révélées être très proches génétiquement, partageant un grand nombre d'allèles en commun, bien que plusieurs groupes génétiques aient été identifiés. Notre analyse confirme également la synonymie entre les souches provoquant la maladie des taches foliaires en raison de la similitude de leurs séquences. Néanmoins le pathovar *raphani* est particulièrement polymorphe et ne constitue pas une lignée bien identifiée. Les souches pour lesquelles nous n'avons pu déterminer d'hôte sensible ainsi que le pathovar *incanae* ont été regroupés ensemble. Au sein du pathovar *incanae*, les pathogènes des *Matthiola* sp. ne partagent strictement qu'un seul allèle avec le pathogène des *Cheiranthus* sp. Une étude complémentaire sur la diversité génétique des *X. campestris* pv. *incanae* pathogènes des Brassicacées ornementales serait nécessaire pour définir si ce pathovar peut être divisé en deux, ou s'il existe également des races au sein de ce pathovar.

Notre étude permet de montrer l'existence d'une grande diversité au sein de cette espèce supérieur aux autres bactéries phytopathogènes comme *Xyllela fastidiosa* (Scally *et al.* 2005) et *Pseudomonas syringae* (Sarkar and Guttman, 2004), étudiés suivant une approche multilocus. Ce fort polymorphisme aurait deux origines d'importance similaire : l'une apportée par des événements de recombinaison et l'autre par une accumulation de mutations. Ces informations indiquent que les *X. campestris* sont susceptibles d'évoluer plus rapidement que d'autres bactéries phytopathogènes, et pourront potentiellement être mieux adaptés à un hôte ou à un environnement particulier. Ainsi les moyens de lutte contre la maladie par l'introduction de cultivars résistants risquent de n'être efficaces qu'à très court terme. En effet, les gènes impliqués dans les interactions avec l'hôte sont supposés évoluer plus rapidement ou susceptibles d'être acquis par transferts horizontaux, confirmant que le contrôle sanitaire des semences est un des moyens les plus efficaces pour contenir la maladie.

Nous avons identifié trois nouvelles races au sein du pathovar *campestris*. Elles s'ajoutent au six précédemment décrites par Vicente *et al.* (2001) et Ka-

moun *et al.* (1992). La grande majorité de nos souches appartiennent à la race 1, identifiée par Vicente *et al.*, (2001) comme l'une des plus représentées dans le monde. L'une des races nouvellement décrites, la race 7, correspondrait à l'une des deux races obtenues par Castañeda *et al.* (2005) par l'introduction d'un plasmide contenant un gène d'avirulence. Leurs travaux suggèrent l'existence potentielle de nouvelles races. Un polymorphisme au niveau des réponses de la plante a été observé suite aux inoculations des races de *X. c. pv. campestris* sur les plantes utilisées pour définir la gamme d'hôte. Ceci suggère que bien plus de 3 races supplémentaires pourraient être décrites. Pour définir plus finement les races au sein de ce pathovar, il conviendrait de pouvoir identifier les gènes impliqués dans l'interaction avec l'hôte. Des gènes de résistances sont connus chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et nous pourrions obtenir facilement les variants pour chacun de ces gènes, puis - suivant les réactions avec les différentes souches - nous pourrions améliorer considérablement ce modèle gène pour gène en étudiant l'interaction *X. campestris* / *A. thaliana*.

Nous n'avons pu identifier de lien entre les groupes génétiques obtenus, le lieu d'isolement des souches et l'appartenance à une race. Cependant le profil génétique majoritaire rassemble principalement des souches de *X. c. pv. campestris* de race 1, et offre deux suggestions : soit ce variant s'est particulièrement bien adapté aux Brassicacées actuellement cultivées, soit la transmission par la semence est le mode de dispersion le plus efficace. Vicente *et al.* (2001) précisent en effet que ce variant serait à l'origine de la majorité des cas de nervation noire répertoriés dans le monde.

Parmi les souches induisant la maladie des taches foliaires (*X. c. pv. raphani*), seule la race 3 a été identifiée au sein de notre collection. Une grande homogénéité a été observée dans le pouvoir pathogène de ces souches ainsi que dans la gamme d'hôtes qu'il attaque. Cette homogénéité dans le pouvoir pathogène est à l'opposé de ce que nous observons au niveau génétique. En effet, ce pathovar a le polymorphisme génétique le plus important. Il serait

intéressant d'étudier si les gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de ce pathovar sont conservés entre les souches. La disponibilité du génome de *X. c. pv. raphani* 756 C pourra nous permettre d'identifier ces gènes possiblement impliqués dans le pouvoir pathogène du pathovars *raphani*.

Mise en place de nouveaux outils de diagnostic pour la détection des *X. campestris* dans les semences de Brassicacées

Plusieurs couples d'amorces disponibles dans la littérature ont été évalués pour leur capacité à détecter spécifiquement les pathovars de l'espèce *X. campestris*. Ces amorces ont été définies dans le gène *hrpF* (Park *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2005, 2006) ou lors d'analyses rep-PCR (Tsygankova *et al.*, 2004) et AFLP (Rijlaarsdam *et al.*, 2004). Suite à notre étude multilocus nous avons également défini un couple d'amorces, tpiA8S/tpiA8R, dans le gène *tpiA*. Ces couples d'amorces permettent d'identifier l'espèce *X. campestris*, aussi bien les souches pathogènes que les non pathogènes. Nous n'avons obtenu qu'un seul profil particulier avec les couples d'amorces définis par (Rijlaarsdam *et al.*, 2004). Aucune de ces amorces ne peut être considérée comme pathovar spécifique; cependant elles peuvent être utilisées pour identifier rapidement des pathovars. C'est d'ailleurs dans les allèles spécifiques de ces derniers que nous nous proposons de rechercher de nouvelles amorces.

La disponibilité du génome de *X. c. pv. raphani* 756 C pourrait nous permettre d'identifier les gènes spécifiques de ce pathovar comparés aux deux *X. c. pv. campestris* séquencés ATCC 33913 (da Silva *et al.*, 2002) et Xcc 8004 (Quian *et al.*, 2005), puis d'identifier parmi les gènes spécifiques de *X. c. pv. raphani* 756 C ceux qui sont identiques aux autres souches appartenant à ce pathovar. Nous procéderions de la même manière pour identifier les gènes spécifiques de *X. c. pv. campestris*. L'obtention d'oligomères spécifiques de ces deux pathovars de l'espèce *X. campestris* attaquant les brassicacées légu-

mières, pourrait être utilisée pour la création d'une puce à ADN permettant d'identifier tous les pathogènes des Brassicacées transmis par les semences (*Pseudomonas*, *Alternaria*, ...).

Deux méthodes d'enrichissement bactérien ont été mises au point, couplées à une amplification d'ADN cible par PCR en temps réel et permettant la détection des *X. campestris* vivants dans les semences de Brassicacées.

La première, la BIO-PCR, est un enrichissement des *X. campestris* contenus dans le macérat de graines sur le milieu semi sélectif YPACvc, élaboré au cours de ces travaux,. Nous avons démontré qu'un temps d'incubation de 36 heures est suffisant pour détecter jusqu'à 10 ufc/ml. Cette technique a prouvé son efficacité pour détecter la présence de *X. campestris* dans des lots de semences naturellement contaminées. Dans le cadre d'une collaboration avec la SNES, la technique sera intégrée à une procédure de validation basée sur des essais interlaboratoires concernant des lots de semences variées.

La seconde méthode d'enrichissement utilise le processus naturel de colonisation de *X. campestris* du plantule lors de la germination des semences. Les premiers résultats de mise au point de la SEED-PCR laisse apparaître une efficacité comparable à la BIO-PCR. Elle présente l'avantage supplémentaire d'être peu onéreuse. Nous proposons également un temps de germination-enrichissement de 72 heures : temps nécessaire à une bonne multiplication des *X. campestris* et pour que l'ADN des cellules mortes soit hydrolysé par les ribonucléases libérées lors de la germination des semences. Cette technique est évaluée actuellement sur son potentiel de détection des *X. campestris* vivants dans des lots de semences naturellement contaminées. Elle fera l'objet d'une validation plus poussée en collaboration avec la SNES.

Bibliographie

Alavi M, Brin C, Manceau C, 2004. Caractérisation génétique du pathovar phaseoli responsable de la graisse commune du haricot. *Sixièmes Rencontres Plantes-Bactéries*. AUSSOIS 11-15 Janvier - Poster.

Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA, 2006. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution* 259, 89-120.

Alvarez AM, Benedict AA, Mizumoto CY, Hunter JE, Gabriel DW, 1994. Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. *Phytopathology* 84, 1449-1457.

Alvarez AM, Cho JJ, 1978. Black rot of cabbage in Hawaii: Inoculum source and disease incidence. *Phytopathology* 68, 1456-1459.

Andrewes AG, Jenkins CL, Starr MP, Shepherd J, Hope H, 1976. Structure of xanthomonadin I, a novel dibrominated aryl-polyene pigment produced by the bacterium *Xanthomonas juglandis*. *Tetrahedron Letters* 45, 4023-4024.

Awadalla P, 2003. The evolutionary genomics of pathogen recombination. *Nature Reviews Genetics* 4, 50-60.

Aylor DL, Price EW, Carbone I, 2006. SNAP: Combine and Map modules for multilocus population genetic analysis. *Bioinformatics* 22, 1399-1401.

Bailey CD, Koch MA, Mayer M, Mummenhoff K, O'Kane Jr SL, Warwick SI, Windham MD, and Al-Shehbaz IA 2006. Toward a Global Phylogeny of the Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution* 23, 2142-2160.

Bain D, 1952. Reaction of brassica seedling to black rot. *Phytopathology* 84,

1449-1457.

Basim H, Stall R, Minsavage G, Jones J, 1999. Chromosomal gene transfer by conjugation in the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 89, 1044-1049.

Becker A, Katzen F, Pühler A, Ielpi L, 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50, 145-152.

Berg T, Tesoriero L, Hailstones DL, 2005. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in Brassica seed. *Plant Pathology* 54, 416-427.

Berg T, Tesoriero L, Hailstones DL, 2006. A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. *Letters in Applied Microbiology* 42, 624-630.

Bergey DH, Harrison FC, Breed RS, Hammer BW, Huntoon FM, 1923. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 1st Edition, Baltimore: Williams and Wilkins, Co. 442 pages.

Blakeman JP, 1991. Foliar bacterial pathogens: Epiphytic growth and interactions on leaves. *Journal of applied bacteriology* 70, no. Suppl.

Boudon S, Manceau C, Nottéghem JL, 2005. Structure and Origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* Populations Causing Bacterial Spot of Stone Fruit Trees in Western Europe. *Phytopathology* 95, 1081-1088.

Boureau T, Jacques MA, Berruyer R, Dessaux Y, Dominguez H, Morris CE, 2004. Comparison of the Phenotypes and Genotypes of Biofilm and Solitary Epiphytic Bacterial Populations on Broad-Leaved Endive. *Microbial Ecology* 47, 87-95.

Bradbury JF, 1984. *Xanthomonas* Dowson. 1939. In: *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*, Vol. 1 Krieg NR, Holt JG, eds. Williams & Wilkins, Baltimore.

199-210.

Bradbury JF, 1986. *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB International Mycological Institute. Kew, Surrey, UK. 198-260.

Breed RS, Murray EGD, Smith NR, 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th Edition - Baltimore: The Williams and Wilkins Company, pp 1094.

Brenner DJ, Fanning GR, Rake AV, Johnson KE, 1969. Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Analytical biochemistry* 28, 447-459

Brenner DJ, Staley JT, Krieg NR, 2005. Classification of Prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. GM Garrity, DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley editors in *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Second edition*, vol. 2 (The Proteobacteria), Part A (Introductory Essays), Springer, New York, 2005, 27-32.

Burkholder WH, 1930. The genus *Phytomonas*. *Phytopathology* 20, 1-23

Burkholder WH, 1941. The black rot of *Barbarea vulgaris*. *Phytopathology* 31, 347-348.

Burrill TJ, 1882. The bacteria : An account of their nature and effects, together with a systematic description of the species. Illinois Industrial University, 11th Report : 93-157.

Canteros BI, Minsavage GV, Jones JB, Stall RE, 1995. Diversity of plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85, 1482-1486.

Castañeda A, Reddy JD, El-Yacoubi B, Gabriel DW, 2005. Mutagenesis of all eight avr genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one avr gene affected race specificity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18 1306-1317.

Cavell AC, Lydiate DC, Parkin IAP, Dean C, Trick M, 1998. Collinearity between a 30-centimorgan segment of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions within the *Brassica napus* genome. *Genome* 41, 62-69.

Chalandre MC, 2000. Éléments de Botanique : Cours de première année de Pharmacie UFR de Pharmacie et Ingénierie de la Santé - ANGERS [http://www.123bio.net/cours/bv/bv_4.html#cappa].

Chang CJ, Donaldson R, Crowley M, Pinnow D A, 1991. New semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology* 81, 449-453.

Chitarra LG, Langerak CJ, Bergervoet JHW, van den Bulk RW, 2002. Detection of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Seed Extracts of *Brassica* sp. Applying Fluorescent Antibodies and Flow Cytometry. *Cytometry* 47, 118-126.

Christensen H, Kuhnert P, Olsen JE, Bisgaard M, 2004. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the Pasteurellaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1601-1609.

Coenye T, Gevers D, Van De Peer Y, Vandamme P, Swings J, 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiology Reviews* 29 147-167.

Cohan FM, 2001. Bacterial Species and Speciation. *Systematic Biology* 50, 513-524.

Cohan FM, 2002. What are bacterial species? *Annual review of microbiology* 56, 457-487.

Cohn F, 1872. Untersuchungen über Bakterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 1, 127-224.

Collin F, Serpeille A, 2000. Inventaire des maladies en production de semence de choux. *Proceedings of AFPP Sixième conférence internationale sur les maladies des Plantes*. Tours, France, 403-410.

Colwell RR 1970. Polyphasic taxonomy of bacteria. In: H Iizuka and T Hasegawa (Eds.) *Culture Collections of Microorganisms*. University of Tokyo Press Tokyo, 421-436.

Comas I, Moya A, Azad RK, Lawrence JG, Gonzalez-Candelas F, 2006. The Evolutionary Origin of Xanthomonadales Genomes and the Nature of the Horizontal Gene Transfer Process. *Molecular Biology and Evolution* 23, 2049-2057.

Cook AA, Larson RH, Walker JC, 1952. Relation of the black rot pathogene to cabbage seed. *Phytopathology* 42, 316-320.

Corpet F, 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16, 10881-10890.

Cowan ST, 1968. *A Dictionary of Microbial Taxonomic Usage*. Oliver and Boyd, Edinburgh.

da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Montero-Vitorello CB, Van Sluys MA., Almeida NF, Alves LMC, do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LEA, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli RBM, Coutinho LL, Curtino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJS, Ferreira RCC, Ferro MIT, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EGM, Lemos MVF, Locali EC, Machado MA, Madeira AMBN, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menk CFM, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Noto MTM, Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JAD, Silva C, de Souza RF, Spinola LAF, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RID, Trindade dos Santos M, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP, 2002. Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities. *Nature*

417, 459-463.

Daniels MJ, 1992 Interaction of Xanthomonas with crucifers. *European Journal of Plant Pathology* 98, Supplement 2, 147-155.

Daniels MJ, Barber CE, Turner PC, Sawczyk MK, Byrde BW, Fielding AH, 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of Xanthomonas campestris pv. campestris using the broad host range cosmid pLAFR1. *The EMBO Journal* 3, 3323-3328.

Daniels MJ, Fan MJ, Barber CE, Clarke BR, Parker JE, 1991. Interaction between Arabidopsis thaliana and Xanthomonas campestris. In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Hennecke H, Verma DPS, eds. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 1. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 84-89.

Dawson WJ, 1939. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. *Zentralblatt für Bakteriologie u.s.w. Abt.2* 100, 177-193.

De Ley 1992. The Proteobacteria: Ribosomal RNA Cistron Similarities and Bacterial Taxonomy. In: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. New York: Springer-Verlag.

De Vos P, De Ley J, 1983. Intra-and intergeneric similarities of Pseudomonas and Xanthomonas ribosomal ribonucleic acid cistrons. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 33, 487-509.

De Vos P, Goor M, Gillis M, De Ley J, 1985. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic Pseudomonas species. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 35, 169-184.

Doré C, Varoquaux F 2006. *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées*, Savoir Faire, INRA édition pp 812.

Dye DW, Bradbury JF, Goto M, Hayward A, Lelliott RA, Schroth MN, 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology* 59, 153-168.

Dye DW, Lelliott RA 1974. Genus II. Xanthomonas. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, edited by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons. Baltimore: Williams and Wilkins, Co.

Dzhalilov FS, Tiwari RD, 1995. Soil and cabbage plant debris as infection sources of black rot. *Archives für Phytopathologische und Pflanzenschutz* 29, 383-386.

Ellis J, Dodds P, Pryor T, 2000. The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends in Plant Science* 5, 373-379.

Enersen M, Olsen I, van Winkelhoff AJ, Caugant DA, 2006. Multilocus Sequence Typing of Porphyromonas gingivalis Strains from Different Geographic Origins. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 35-41.

Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG, 2000. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of Staphylococcus aureus. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1008-1015.

Euzéby JP, 2005. Nomenclature des procaryotes. In Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire© J.P. Euzéby 1998-2006¹.

Faber FC von, 1907. Über eine bakterienkrankheit der Levkoyen. *Arb.K. boil. Anst. f. Land. u. Forstw.* 5, 489-492.

Fargier E, Manceau C, 2007. Pathogenicity assays restrict the Xanthomonas campestris species (Vauterin et al., 1995) into three pathovars and reveal nine races within X. campestris pv. campestris. *Plant Pathology*, accepted.

¹<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/systematique/nomenclature.html>

Fargier E, Fischer Le Saux M, Manceau C, 2007. Recombination and point mutation contribute to the high genetic diversity of *Xanthomonas campestris* (Vauterin et al., 1995) and to the complex structure of pathovars.

Feil EJ, Holmes EC, Bessen DE, Chan MS, Day NPJ, Enright MC, Goldstein R, Hood DW, Kalia A, Moore CE, Zhou J, Spratt BG, 2001. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 182-187.

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG, 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* 186, 1518-1530.

Feil EJ, Maiden MCJ, Achtman M, Spratt BG, 1999. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Biology and Evolution* 16, 1496-1502.

Feil EJ, Smith JM, Enright MC, Spratt BG, 2000. Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data. *Genetics* 154, 1439-1450.

Feil EJ, Spratt BG, 2001. Recombination and population structures of bacterial pathogens. *Annual Review of Microbiology* 55, 561-590.

Felsenstein J, 2005. PHYLIP (phylogeny inference package) version 3.63. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Fitch WM, Margoliash E, 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* 155, 279-284.

Flor H, 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9, 275-296.

Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P Jr., 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 42, 166-170.

Fracastoro G. 1546. On Contagion, Contagious Diseases and Their Cure.

Franken AAJM, van Zeijl C, van Bilsen JGPM, Neuvel A, Devogel R, van Wingerden Y, Birnbaum YE, van Hateren J, van der Zouwen PS, 1991. Evaluation of a plating assay for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Seed Science and Technology* 19, 215-26.

Franken AAJM, Zilverentant JF, Boonekamp PM, Schots A, 1992. Specificity of polyclonal and monoclonal antibodies for the identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal European Journal of Plant Pathology* 98, 81-94.

Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL, Swings J, 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3, 733-739.

Goncalves ER, Rosato YB, 2002. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S–23S rDNA intergenic spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 52, 355-361.

Grimm R, Vogelsanger J, 1990 . Black rot disease on cabbage, irrigation and spreading. In: *Proceedings of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Budapest, Hungary, June 11-16, 1989. Ukadémiai Kiadó, Budapest, 225-229.

Guindon S, Gascuel O, 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52, 696-704.

Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O, 2005. PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research*

1; 33 (Web Server issue):W557-9.

Guo H, Dickson MH, Hunter JE, 1991. Brassica napus sources of resistance to black rot in crucifers and inheritance of resistance. *Hort Science* 26, 1545-1547.

Hall CJJ van 1900. Twee bakterienziekten. *Tijdschr. over Plantenziekten* 6, 169-177.

Hanage WP, Fraser C, Spratt BG, 2006. Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 1917-1927.

Hancock JF, 2006. *Plant evolution and the origin of crop species*. second edition, CABI Publishing, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK, 234-236.

Hauben L, Vauterin L, Swings J, Moore ER, 1997. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all Xanthomonas species. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 47, 328-335.

Hayward AC, 1974. Latent infection by bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 12, 87-97.

Helm J, 1963. Morphologisch-taxonomische Gliederung der Kultusippen von Brassica oleraceae. *Kulturpflanze* 11, 92-210.

Hemingway JS, 1995. Mustards : Brassica spp. and Sinus alpa. In: Smartt J, Simmonds N (eds) *Evolution of Crop Plant*. Longman Scientific and Technical, Harlow, UK, 82-86.

Hollis JP, 1951. Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology* 41, 350-367.

Holmes DE, Nevin KP, Lovley,DR, 2004. Comparison of 16S rRNA, nifD, recA, gyrB, rpoB and fusA genes within the family Geobacteraceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1591-1599.

Howard 1982. Friedrich Loeffler and His History of bacteriology. *ASM News* 48 297-302.

Huang TC, Lee HL, 1988. Hot acidified zinc sulfate as seed soaking agent for the control of crucifer black rot. *Plant Protection Bulletin* (Taiwan) 30, 245-258.

Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR, 1998. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology* 180, 4765-4774.

Hugouvieux V, Barber CE, Daniels MJ 1998. Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into *Hydathodes* of *Arabidopsis thaliana* Leaves: A System for Studying Early Infection Events in Bacterial Pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 537-543.

Humaydan HS, Harman GE, Nedrow BL, DiNitto LV, 1980. Eradication of *Xanthomonas campestris*, the causal agent of black rot from Brassica seeds with antibiotics and sodium hypochlorite. *Phytopathology* 70, 127-131.

Hunter JE, Abawi GS, Becker RF. 1975. Observation on the source and spread of *Xanthomonas campestris* in an epidemic of black rot in New York. *Plant Disease Reporter* 59, 384-387.

Huson DH, 1998. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* 14, 68-73.

Huson DH, Bryant D, 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23, 254-267.

Ignatov A, Hida K, Kuginuki Y, 1998. Black Rot of Crucifers and Sources of Resistance in Brassica Crops .JARQ Japan Agricultural Research Quarterly 32 online [<http://www.jircas.affrc.go.jp/english/publication/jarq/32-3/ignatov/igna.html>].

Ito S, Ushijima Y, Fujii Y, Tanaka S, Kameya-Iwaki M, Yashiwaru S, Kishi F, 1998.

Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semi-selective medium and a PCR technique. *Journal of Phytopathology* 146, 369-84.

Jacques MA, Josi K, Darrasse A, Samson R, 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* Is Aggregated in Stable Biofilm Population Sizes in the Phyllosphere of Field-Grown Beans. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2008-2015.

Jenkins CL, Starr MP, 1982. The brominated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. *Current Microbiology* 7, 323-326.

Jolley KA, Feil EJ, Chan MS, Maiden MC, 2001. Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* 17, 1230-1231.

Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW, 2004. Reclassification of the Xanthomonads Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 755-762.

Josephson KL., Gerba CP, Pepper IL, 1993. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 59,3513-3515.

Kamdar HV, Kamoun S, Kado CI, 1993. Restoration of pathogenicity of avirulent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pathovars by reciprocal complementation with the *hrpXo* and *hrpXc* genes and identification of HrpX function by sequence analyses. *Journal of Bacteriology* 175, 2017-2025.

Kamoun S, Kamdar HV, Tola E, Kado CI, 1992. Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive responses: role of the *hrpX* locus. *Molecular plant-microbe interactions* 5, 22-33.

Kendrick JB, Baker KF, 1942. Bacterial blight of garden stocks and its control by hot-water seed treatment. *Bulletin of the California Agricultural Experiment*

Station 665, 1-23.

Kimura M, 1968. Evolutionary Rate at the Molecular Level. *Nature* 217, 624 - 626.

Kimura M, 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Klein PG, Juneja VK, 1997. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4441-4448.

Knösel D, 1961. Eine an Kohl blattfleckenerzeugende Varietas von *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten (Pflanzenpathologie) und Pflanzenschutz* 68, 1-6.

Kocks CG, Zadoks JC, 1996. Cabbage refuse piles as source of inoculum for black rot epidemics. *Plant Disease* 80, 789-792.

Koehler A, Karch H, Beikler T, Flemmig TF, Suerbaum S, Schmidt H, 2003. Multilocus sequence analysis of *Porphyromonas gingivalis* indicates frequent recombination. *Microbiology* 149, 2407-2415.

Koenraad H, van Bilsen JGPM, Roberts SJ, 2005. Comparative test of four semi-selective agar media for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in brassica seeds. *Seed Science and Technology* 33, 115-125

Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, Morris Jr JG, Sulakvelidze A, 2002. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Clinical and Environmental *Salmonella* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 1626-1635.

Krieg NR, Garrity GM, 2005. On Using the Manual. In: GM Garrity, DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley editors in *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology second edition, vol. 2* (The Proteobacteria), part A (Introductory Essays), Springer,

New York, 2005, 15-19.

Krieg NR, Holt JG, 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1* - Baltimore: The Williams and Wilkins Company 964 pages.

Kuan TL; Minsavage GV; Schaad NW, 1986. Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected *Brassica campestris*. *Plant Disease* 70, 409-413.

Laâla S, 2004. Mise au point d'une technique moléculaire de détection de l'ARNm des bactéries phytopathogènes dans les semences. Mémoire de fin d'études, DESS Technologies du Végétale.

Lagercrantz U, Lydiate DJ, 1996. Comparative Genome Mapping in *Brassica*. *Genetics* 144, 1903-1910.

Lan TH, Paterson AH, 2000. Comparative Mapping of Quantitative Trait Loci Sculpting the Curd of *Brassica oleracea*. *Genetics* 155, 1927-1954.

Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seeliger HPR and Clark WA. (1976 Revision) 1975. International Code of Nomenclature of Bacteria. *American Society for Microbiology*, Washington, DC: 180 pp.

Lapage SP, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seeliger HPR and Clark WA, 1992. International Code of Nomenclature of Bacteria. P.H.A. Sneath ed. (1990) *American Society for Microbiology*, Washington, DC.

Lechevalier H, Lechevalier MP, 1988. Chemotaxonomic use of lipids - an overview. In: *Microbial Lipids, Vol. 1*, Ratledge, C. and Wilkinson, S.G., Eds., Academic Press, San Diego, CA. 869-902.

Lee BM, Park YJ, Park DS, Kang HW, Kim JG, Song ES, Park IC, Yoon UH, Hahn JH, Koo BS, Lee GB, Kim H, Park HS, Yoon KO, Kim JH, Jung CH, Koh NH, Seo JS, Go SJ, 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar

oryzae KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research* 33, 577-586.

Lin NT, Liu TJ, Lee TC, You BY, Yang MH, Wen FS, Tseng YH, 1999. The Adsorption Protein Genes of *Xanthomonas campestris* Filamentous Phages Determining Host Specificity. *Journal of Bacteriology* 181, 2465-2471.

Llop P, Caruso P, Cubero J, Morente C, Lopez MM, 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* 37, 23-31.

Logan NA 1994. Introduction. Edited by Logan NA in *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publications, 1-12.

Lorenz MG, Wackernagel W, 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 58, 563-602.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG, 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 3140-3145.

Maiden MCJ, 2006. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 60, 561-588.

Manceau C, Brin C, 2003. La structuration génétique des *Xanthomonas* déterminée par AFLP montre une organisation multilignée des pathovars. Poster

Mandel M, 1969. New approaches to bacterial taxonomy: Perspective and prospects. *Annual Review of Microbiology* 23, 239-274.

Massomo SMS, Mortensen CN, Mabagala RB, Newman MA, Hockenhull J, 2004.

Biological Control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *Journal of Phytopathology* 152, 98-105.

Massomo SMS, Nielsen H, Mabagala RB, Mansfeld-Giese K, Hockenhull J, Mortensen CN, 2003. Identification and characterisation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains from Tanzania by pathogenicity tests, Biolog, rep-PCR and fatty acid methyl ester analysis. *European Journal of Plant Pathology* 109, 775-89.

Masters CI, Shallcross JA, Mackey BM, 1994. Effect of stress treatments on the detection of listeria monocystogenes and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *Journal of applied bacteriology* 77, 73-79.

Maynard-Smith J, 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution* 34, 126-129.

Maynard-Smith J, Smith NH, 1998. Detecting recombination from gene trees. *Molecular Biology and Evolution* 15, 590-599.

Maynard-Smith, J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG, 1993. How clonal are bacteria ?. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 4384-4388.

McCulloch L, 1929. A bacterial leaf spot of horse-radish caused by *Bacterium campestre* var. *armoraciae* n. var. *Journal of Agricultural Research* 38, 269-287.

Messiaen CM, Blancard D, Rouxel F, Lafon R, 1991. *Les maladies des plantes maraîchères*. INRA, Paris, FRANCE 552 pp.

Meyer D, Lauber E, Roby D, Arlat M, Kroj T, 2005. Optimization of pathogenicity assays to study the *Arabidopsis thaliana*-*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathosystem. *Molecular Plant Pathology* 6, 327-333.

Minsavage GV, Schaad NW, 1983. Characterization of membrane proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phytopathology* 73, 747-755.

- Nei M, Gojobori T, 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 3, 418-426
- O'Neill CM, Bancroft I, 2000. Comparative physical mapping of segments of the genome of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* that are homoeologous to sequenced regions of chromosomes 4 and 5 of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 23, 233-243.
- Ochiai H, Inoue Y, Takeya M, Sasaki A, Kaku H, 2005. Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. *JARQ Japan Agricultural Research Quarterly* 39, 275-287.
- Onsando JM, 1992. Black rot of crucifers. In Chaube HS, Singh US, Mukhopadyay AN, Kumar J (eds), *Plant Diseases of International Importance*. Diseases of Vegetables and Oil Seed Crops, Prentice Hall, Englewood Cliffs NJ, 243-252.
- Palleroni NJ, Bradbury JF, 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al., 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 606-609
- Pammel LH, 1895. Bacteriosis of rutabaga (*Bacillus campestris* n. sp.). *Bulletin of the Iowa State College Agriculture Experiment Station* 27, 130-134.
- Park YJ, Lee BM, Ho-Hahn J, Lee GB, Park DS, 2004. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species-specific primers based on *hrpF* gene sequences. *Microbiological Research* 159, 419-423.
- Parker JE, Barber CE, Fan MJ, Daniels MJ, 1993. Interaction of *Xanthomonas campestris* with *Arabidopsis thaliana*: characterization of a gene from *X.c.* pv. *raphani* that confers avirulence to most *A. thaliana* accessions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6, 216-224.

- Patel MK, Abhyankar SG, Kulkarni YS, 1949. Black rot of cabbage. *Indian Phytopathology* 2, 58-61.
- Paterson AH, Bowers JE, Estill JC, Osborn TC, Pires JC, Amasino R, Quiros CF, Farnham M, 2006. Evolutionary history of the angiosperms and its relevance to Brassica. *In proceeding of the joint meeting of the XIV Crucifer Genetics Workshop and the IV ISHS International Symposium on Brassicas.* edited by Y.P. Lim in *Acta Horticulturae* 706, 49-54.
- Pitrat M, Foury C, 2003. *Histoires de légumes, des origines à l'orée du XXIe siècle.* INRA Editions, 410 pp.
- Poplawsky AR, Chun W, 1998. Xanthomonas campestris pv. campestris requires a functional pigB for epiphytic survival and host infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 466-475.
- Poplawsky AR, Chun W, 2002. Xanthomonas campestris pv. campestris extracellular polysaccharide is required for natural host infection as well as virulence. *Phytopathology* 92, S66.
- Poplawsky AR, Urban SC, Chun W, 2000. Biological role of xanthomonadin pigments in Xanthomonas campestris pv. Campestris. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5123-5127.
- Posada D, Crandall KA, 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.
- Prakash S, Hinata K, 1980. Taxonomy, cytogenetics, and origin of crop Brassica, a review. *Opera Botanica* 55:1-59
- Price EW, Carbone I, 2005. SNAP: workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. *Bioinformatics* 21, 402-404.
- Pyrame de Candolle A, 1813. *Théorie élémentaire de la botanique ou exposition*

des principes de la classification naturelle et de l'art de décrire et d'étudier les végétaux. 1ère éd., Paris, Déterville.

Qian W, Jia Y, Ren SX, He YQ, Feng JX, Lu LF, Sun Q, Ying G, Tang DJ, Tang H, Wu W, Hao P, Wang L, Jiang BL, Zeng S, Gu WY, Lu G, Rong L, Tian Y, Yao Z, Fu G, Chen B, Fang R, Qiang B, Chen Z, Zhao GP, Tang JL, He C, 2005. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Research* 15, 757-767.

Rademaker JLW, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, de Bruijn FJ, 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 665-677.

Rademaker JLW, Louws FJ, Schultz MH, Rossbach U, Vauterin L, Swings J, de Bruijn FJ, 2005. A Comprehensive Species to Strain Taxonomic Framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* 95, 1098-1111.

Randhawa PS, Schaad NW, 1984. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology* 74, 268-272.

Ride M, Ride S, 1992. *Xanthomonas populi* (ex Ride 1958) sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 652-653.

Rijlaarsdam A, Woudt B, Simons G, Koenraadt, Oosterhof J, Asma M, Buddiger P, Roorda P, Grimault V, De Koning J. 2004. Development of specific primer for the molecular detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *EPPO Conference on Quality of Diagnosis and New Diagnostic Methods for Plant Pests*. Noordwijkerhout, NL, 2004-04-19/22.²

Roberson EB, Firestone MK, 1992. Relationship between Desiccation and Ex-

²On-line poster http://archives.eppo.org/MEETINGS/2004_meetings/diag_posters/poster_deKoning2.pdf.

opolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1284-1291.

Roberts SJ, Koenraadt H, 2002. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage (Brassica). *International Seed Health Initiative - Vegetable DRAFT*.

Roberts SJ, Koenraadt H, 2006. 7-019: Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp. Version 3.0, 05 July 2006. International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods. *International Seed Testing Association* (ISTA), Bassersdorf, Switzerland (<http://www.seedtest.org/en/content—1-1132-241.html>)

Rosselló-Mora R, Amann R, 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 39-67.

Rossier O, Van den Ackerveken G, Bonas U, 2000. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Molecular Microbiology* 38, 828-838.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.

Ruissen MA, Gielink AJ 1994. The development of black rot in cabbage as a result of differences in guttation between cultivars, and the relation of guttation to infectiousness. Colloque - INRA in *Proceedings of the 8th International conference on Plant Pathogenic Bacteria* 66, 767-774.

Saddler GS, Bradbury JF, 2005. Family I. Xanthomonadaceae fam. nov. In: GM Garrity, DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley editors in *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology second edition, vol. 2* (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), Springer, New York, 2005, 63-90.

Samish Z, Etinger-Tulczynska R, Bick M, 1963. The flora within the tissue of fruit

and vegetables. *Journal of Food Science* 28, 259-266.

Sarkar SF, Guttman DS, 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1999-2012.

Sauer JD, 1993. Historical geography of crop plants - a select roster. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Savastano L, 1886. Les maladies de l'olivier : hyperplasies et tumeurs. Paris, *Comptes Rendues de l'Academie des Sciences* 103, 1278-1281.

Scally M, Schuenzel EL, Stouthamer R, Nunney L, 2005. Multilocus Sequence Type System for the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa* and Relative Contributions of Recombination and Point Mutation to Clonal Diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8491-8499.

Schaad NW, 1989. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifers. In: Saettler AW, Schaad NW, Roth DA, editors. *Detection of plant pathogenic bacteria in seed and other planting material*. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society Press; 68-75

Schaad NW, Alvarez A, 1993. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Cause of black rot of crucifers. In: Swing JG and Civerolo EL (eds) *Xanthomonas*, Chapman and Hall, London, United Kingdom, 51-56

Schaad NW, Cheong SS, Tamaki S, Hatziloukas E, Panopoulos NJ, 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85, 243-8

Schaad NW, Dianese JC, 1981. Cruciferous weeds as source of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathology* 71, 1215-1220.

Schaad NW, Franken AAJM, 1996. Black rot *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

ISTA Handbook on Seed Health Testing Working Sheet No 50. *International Seed Testing Association ISTA*, Zurich, Switzerland

Schaad NW, Gabrielson RL, Mulanax MW 1980. Hot Acidified Cupric Acetate Soaks for Eradication of *Xanthomonas campestris* from Crucifer Seeds. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 803-807.

Schaad NW, Kendrick R A 1975. A qualitative method of detecting *Xanthomonas campestris* in crucifer seed. *Phytopathology* 65 1034 1036

Schaad NW, Postnikova E, Lacy GH, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, Vidaver AK, 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. citri (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. citri (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. aurantifolii (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. citrumelo (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. malvacearum (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. smithii nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. alfalfae (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. alfalfae (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. fuscans" of *X. campestris* pv. phaseoli (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. fuscans sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 494-518.

Schaad NW, Sitterly WR, Humaydan H, 1980. Relationship of incidence of seed-borne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. *Plant Disease* 64, 91-92.

Schaad NW, Vidaver AK, Lacy GH, Rudolph K, Jones JB, 2000. Evaluation of proposed amended names of several pseudomonads and xanthomonads and recommendations. *Phytopathology* 90, 208-213.

Schaad NW, White WC, 1974. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. *Phytopathology* 64, 1518-1520.

Schleifer KH, Ludwig W, 1994. Molecular taxonomy: classification and identifica-

tion. Edited by FG Priest, A Ramos-Cormenzana and BJ Tindall. In *Bacterial Diversity and Systematics*. New York: Plenum Press. 1-15.

Schultz T, Gabrielson RL, 1986. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Western Washington crucifer seed fields: occurrence et survival. *Phytopathology*; 76, 1306-1309.

Shaw JJ, Kado CI, 1987. Whole plant wound inoculation for consistent reproduction of black rot of crucifers. *Phytopathology* 78, 981-986.

Shaw JJ, Settles LG, Kado CI, 1988. Transposon Tn4431 mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of a nonpathogenic mutant and cloning of a locus for pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1, 39-45.

Sheridan GEC, Masters CI, Shallcross JA, Mackey BM, 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1313-1318.

Shigaki T, Nelson SC, Alvarez AM, 2000. Symptomless spread of blight inducing strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage seedling in misted seedbeds. *European journal of plant pathology* 106, 339-346.

Shih HD, Lin YC, Huang HC, Tzen KC, Hsu ST, 2000. A DNA probe for identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the causal organism of black rot of crucifers in Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 41, 113-120.

Shimodaira H, Hasegawa M, 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular biology and evolution* 16, 1114-1116.

Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30, 225-420.

Smith EF, 1901. Entgegnung auf Alfred Fischer's "Antwort" in betreff der Existenz von dutch Bakterien verursachten Pflanzenkrankheiten. *Zweiter Tell. Centralb. Bakteriolog. Abt. II*, 7, 88-100, 128-139, 190-99

Sneath P, 1957. The application of computers to taxonomy. *Journals of General Microbiology* 17, 201-226.

Soengas P, Hand P, Vicente JG, Pole JM, Pink DAC, 2007. Identification of quantitative trait loci for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica rapa*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 114, 637-645.

Solca NM, Bernasconi MV, Valsangiacomo C, Van Doorn LJ, Piffaretti JC, 2001. Population genetics of *Helicobacter pylori* in the southern part of Switzerland analysed by sequencing of four housekeeping genes (*atpD*, *glnA*, *scoB* and *recA*), and by *vacA*, *cagA*, *iceA* and IS605 genotyping. *Microbiology* 147, 1693-1707.

Song K, Osborn TC, Williams PH, 1990. Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 79, 497- 506.

Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ, 2004. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species – the eBURST approach. *FEMS Microbiology Letters* 241, 129-134.

Stackebrandt E, 2000. Defining Taxonomic Ranks. In: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. New York: Springer-Verlag.

Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kampfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Truper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB, 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1043-1047.

- Stackebrandt E, Goebel BM, 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA re-association and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 44, 846-849.
- Stackebrandt E; Murray RGE; Trueper HG, 1988. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 321-325.
- Stall RE, Loschke DC, Jones JB, 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 76, 240-243.
- Starr MP, 1981. The genus *Xanthomonas*. In: *The prokaryotes*. Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balows A, Schlegel HG, eds. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 742-763.
- Stevens PF, 2001. Angiosperm Phylogeny Website. Version 7, May 2006 ³
- Suerbaum S, Achtman M, 1999. Evolution of *Helicobacter pylori*: the role of recombination. *Trends in Microbiology* 7, 182-184.
- Swings J, Vauterin L, Kersters K, 1993. The Bacterium *Xanthomonas*. In *Xanthomonads*, Edited by Swing JG, Civerolo EL. In *Xanthomonads*. London, UK. Chapman and Hall publication, 121-156.
- Szurek B, Rossier O, Hause G, Bonas U, 2002. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular Microbiology* 46, 13-23.
- Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- The Arabidopsis Genome Initiative 2000. *Nature* 408, 796 - 815.

³<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Buttner D, Caldana C, Gaigalat L, Goesmann A, Kay S, Kirchner O, Lanz C, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mittenhuber G, Nies DH, Niesbach-Klosgen U, Patschkowski T, Ruckert C, Rupp O, Schneiker S, Schuster SC, Vorholter FJ, Weber E, Puhler A, Bonas U, Bartels D, Kaiser O, 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal of Bacteriology* 187,7254-66.

Thompson KF, 1979. Cabbages, kales, etc.: *Brassica oleracea* (Cruciferae). In Simmonds NE (ed) *Evolution of crops species*. Longman, London pp 49-52.

Trebaol G, Gardan L, Manceau C, Tanguy JL, Tirilly Y, Boury S, 2000. Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae* sp. nov., a new species that causes bacterial bract spot of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1471-1478.

Trüper HG, Stackebrandt E, Schleifer KH 2001. Prokaryote Characterization and Identification. In: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, Springer-Verlag.

Tsygankova SV, Ignatov AN, Boulygina ES, Kuznetsov BB, Korotkov EV, 2004. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* revealed by novel rep-PCR primers. *European Journal of Plant Pathology* 110, 845-853.

U N, 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany* 7, 389-452.

Valverde A, Hubert T, Stolov A, Dagar A, Kopelowitz J, Burdman S, 2007. Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. *Plant Pathology* 56, 17-25.

van Berkum P, Elia P, Eardly BD, 2006. Multilocus Sequence Typing as an Approach for Population Analysis of Medicago-Nodulating Rhizobia. *Journal of Bacteriology* 188, 5570-5577.

van den Mooter M, Swings J. 1990. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 Xanthomonas strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 348-369.

van der Wolf JM, van der Zouwen PS, Garbeva P, 2006. Transmission of Xanthomonas campestris pv. campestris by insects. Proceeding of the 11th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 10th to 14 th july 2006, Edinburgh, Scotland, United Kingdom.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J, 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* 60, 407-438.

Vauterin L, Hoste B, Kersters K Swings J, 1995. Reclassification of Xanthomonas. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 472-489.

Vauterin L, Hoste B, Yang P, Alvarez A, Kersters K, Swings J, 1993. Taxonomy of the genus Xanthomonas. Edited by Swing JG, Civerolo EL. In *Xanthomonads*. London, UK. Chapman and Hall publication, 157-192.

Vauterin L, Rademaker J, Swings J, 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus Xanthomonas. *Phytopathology* 90, 677-682.

Vauterin L, Swings J, 1997. Are classification and phytopathological diversity compatible in Xanthomonas? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19, 77-82.

Vauterin L, Swings J, Kersters K, 1991. Grouping of Xanthomonas campestris pathovars by SDS-PAGE of proteins. *Journal general microbiology* 137, 1677-1687.

Vauterin L, Swings J, Kersters K, Gillis M, Mew TW, Schroth MN, Palleroni NJ, Hildebrand D. C, Stead DE, Civerolo EL, Hayward AC, Maraite H, Stall RE, Vidaver AK, Bradbury JF. 1990. Towards an improved taxonomy of Xanthomonas. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 312-316.

Vauterin L, Yang P, Swings J, 1996. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new Xanthomonas species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 298-304.

Vicente JG, Conway J, Roberts SJ, Taylor JD, 2001. Identification and origin of Xanthomonas campestris pv. campestris race and related pathovars. *Phytopathology* 91, 492-499.

Vicente JG, Everett B, Roberts SJ, 2006. Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as Xanthomonas campestris pv. raphani and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. *Phytopathology* 96, 735-745.

Vicente JG, Taylor JD, Sharpe AG, Parkin IAP, Lydiate DJ, King GJ, 2002. Inheritance of Race-Specific Resistance to Xanthomonas campestris pv. campestris in Brassica Genomes. *Phytopathology* 92, 1134-1141.

Vos M, Velicer GJ, 2006. Genetic Population Structure of the Soil Bacterium Myxococcus xanthus at the Centimeter Scale. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3615-3625.

Wakker JH, 1883. Vorläufige Mittheilungen über Hyacinthenkrankheiten. *Botanisches Centralblatt* 14, 315-317.

Walker G, 2005. Profil de la culture du chou et du brocoli au Canada. *Agriculture et Agroalimentaire Canada* 1-47. ⁴

Walker JC, 1952. Disease of crucifers. In *Diseases of vegetable crops*. McGrawHill,

⁴[http://www.agrireseau.qc.ca/legumeschamp /documents/brocc-cabb_f.pdf]

New York 128-131.

Watson L, Dallwitz MJ, 1992. Onwards. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 29th July 2006. <http://delta-intkey.com>.

Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky L, Moore LH, Moore WC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Trüper HG, 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37 463-464.

Weiss BD, Capage MA, Kessel M, Benson S A, 1994. Isolation and characterization of a generalized transducing phage for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Bacteriology* 176, 3354-3359.

Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N, Stead DE, 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2853-8.

Wertz JE, Goldstone C, Gordon DM, Riley MA, 2003. A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept. *Journal of Evolutionary Biology* 16, 1236-1248.

Whetzel HH, 1918. *An outline of the history of phytopathology*. W.B. Saunders, Philadelphia, London

White HE 1930. Bacterial spot of radish and turnip. *Phytopathology* 20, 653-662.

White HE, Gardner MW, 1929. Bacterial spot of radish and turnip. *Phytopathology* 19, 97.

Wilkinson JF, 1958. The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriological Reviews* 22, 46-73.

Willems A, Gillis M, Kersters K, Van Den Broecke L, De Ley J, 1987. Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 to a new genus, *Xylophilus* gen. nov. as *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos 1969) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 422-430.

Williams PH, 1980. Black Rot: A continuing threat to world crucifers. *Plant disease* 64, 736-742.

Woese CR 1999. Prokaryote Systematics: The Evolution of a Science. In: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, Springer-Verlag.

Woese CR, 1987. Bacterial evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 51, 221-271.

Woese CR, George Fox E, 1977. Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74, 5088-5090.

Wukasch RT, 1990. Maladies fongiques des crucifères cultivée. Fiches Techniques du Ministère de l'Agricultures, de l'Alimentation et des Affaires Rurales [<http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/90-255.htm>].

Wulff EG, Mguni CM, Mortensen CN, Keswani CL, Hockenhull J, 2002. Biological Control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 317-325.

Xiong Z, Liu C, Geng B, 2006. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 273-280.

Yang P, Vauterin L, Vancanneyt M, Swings J, Kersters K, 1993 Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*.

Systematic and Applied Microbiology 16, 47-71.

Yang YW, Lai KN, Tai PY, Li WH, 1999. Rates of Nucleotide Substitution in Angiosperm Mitochondrial DNA Sequences and Dates of Divergence Between Brassica and Other Angiosperm Lineages. *Journal of Molecular Evolution* 48, 597-604.

Young JM, 1969. An alternative weed host for *Xanthomonas campestris*. *Plant Disease* 53, 820-821.

Young JM, Bull CT, De Boer SH, Firrao G, Gardan L, Saddler GE, Stead DE, Takikawa Y, 2001. Classification, Nomenclature, and Plant Pathogenic Bacteria - A Clarification. *Phytopathology* 91, 617-620.

Young JM, Bull CT, De Boer SH, Firrao G, Gardan L, Saddler GE, Stead DE, Takikawa Y, 2005. Names of Plant Pathogenic Bacteria, 1864-2004. International Society for Plant Pathology.⁵

Young JM, Dye DW, Bradbury JF, Panagopoulos CG, Robbs CF, 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N.Z. Journal of Agricultural Research* 21, 153-177.

Yuen GY; Alvarez AM; Benedict AA; Trotter KJ, 1987. Use of monoclonal antibodies to monitor the dissemination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phytopathology* 77, 366-370

Zhao Y, Damicone JP, Bender CL, 2002. Detection, Survival, and Sources of Inoculum for Bacterial Diseases of Leafy Crucifers in Oklahoma. *Plant disease* 86, 883-888

Zhao Y, Damicone JP, Demezas DH, Bender CL, 2000. Bacterial Leaf Spot Diseases of Leafy Crucifers in Oklahoma Caused by Pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Plant disease* 84, 1008-1014.

⁵http://www.isppweb.org/names_bacterial_revised.asp

Zmasek CM, Eddy SR, 2001. ATV: display and manipulation of annotated phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 383-384.

Zuckerandl E, Pauling L, 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* 8, 357-366.

L'étude de la pathologie de *X. campestris* et de la structure génétique de ses pathovars a permis l'amélioration de la détection du pathogène dans les semences de Brassicacées

Les *Xanthomonas campestris* induisent des maladies sur les plantes de la famille des Brassicacées. L'une de ces maladies la nervation noire est considérée comme l'une des plus dommageables des brassicacées. Cette espèce comprend six pathovars, définis en fonction du type de symptômes provoqués et de la plante hôte d'isolement. Cependant, des doutes ont été émis sur la synonymie de certains de ces pathovars, or il est indispensable de pouvoir identifier sans ambiguïté ces pathovars afin de mettre en place des stratégies de lutte contre ces bactérioses. Bien que les sources de contamination soient multiples, la semence reste la cause principale de l'infection des plantes. S'assurer de leur qualité sanitaire est le moyen de lutte le plus efficace contre les bactérioses.

L'objectif de ce travail était de clarifier la pathogénie et la structure génétique de cette espèce, puis de proposer un nouvel outil de détection fiable et rapide des *X. campestris* vivants dans les semences. L'étude de la pathologie de l'espèce *X. campestris* indique qu'il existe trois pathovars capables de provoquer une maladie, *X. c. pv. campestris* provoque la nervation noire, *X. c. pv. raphani* induit la maladie des taches foliaires, *X. c. pv. incanae* engendre la maladie du dépérissement des giroflées.

Nous discutons la taxonomie des espèces du genre *Xanthomonas* par une approche MLSA. Notre analyse génétique MLSA/MLST révèle que l'espèce *X. campestris* est particulièrement complexe et polymorphe. Cette diversité aurait deux origines d'importance similaire, la recombinaison et les mutations. L'espèce semblerait néanmoins conserver une structure clonale en raison d'une étroite communauté d'hôte. Les pathovars ne forment pas des lignées génétiques identifiées, toutefois ils ne sont pas mélangés entre eux et partagent des séquences proches.

Nous avons mis au point une méthode de détection de *X. campestris* vivant dans les semences par BIO-PCR. Elle permet de détecter jusqu'à 10 ufc/ml de macérat de semence.

Study of the pathogenicity of *X. campestris* and the genetic structure of pathovars improve pathogen detection in Brassicaceae seed

Xanthomonas campestris causes diseases on Brassicaceae family including black rot that is considered as the most important diseases of cruciferous plant. This bacterial species groups six pathovars defined according to the type of symptoms that they induce to the host plant from which they were isolated and according to their host range. However doubts have been expressed about the synonymy of some pathovars within *X. campestris*. It has been necessary to identify pathovars without ambiguity in order to improve strategies against these pathogens. Although sources of contamination are various, seeds constitute the primary inoculum and their sanitary control thus appears as the most efficient disease control strategy.

Our objectives have been to clarify the pathogenicity and the genetic structure of the species then to propose a new diagnostic tool that permits the fast and valuable detection of viable *X. campestris* in seeds. Pathogenicity study of *X. campestris* species revealed the existence of only three pathovars that can induce disease, *X. c. pv. campestris* causes the black rot disease, *X. c. pv. raphani* induces the leaf spots disease and *X. c. pv. incanae* causes the bacterial blight of garden Stocks.

We discussed on the *Xanthomonas* genus taxonomy based on MLSA data. Our genetic analysis shows how particularly complex and polymorphic is *X. campestris*. This diversity is the consequence of two evolutionary forces, recombination and mutation, with equally importance. However, this species keeps a clonality structure owing to a tightly host communality within Brassicaceae host. Pathovars are not genetic lineage, but there are not shuffled and share close sequences.

We have set up a detection method of viable *X. campestris* in seeds by BIO-PCR. The BIO-PCR can detect until 10 ufc/ml in seed extract.