

UNIVERSITE DE LA REUNION
Faculté des Sciences et Technologies
UMR 53 : Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical
CIRAD-Université de la Réunion

THESE

Présentée à l'Université de La Réunion
pour obtenir le titre de Docteur en Sciences

Formation doctorale : Ecole Doctorale Interdisciplinaire

**Taxonomie et classification en pathovars
des *Xanthomonas* associés aux Anacardiées
par une approche polyphasique**

Par

Nathalie AH-YOU

devant la commission d'examen :

W. ACHOUAK
C. MANCEAU
P. BESSE
L. GAGNEVIN
P. A. D. GRIMONT
O. PRUVOST

Chargée de recherche HDR- CEA Cadarache
Ingénieur de recherche HDR- INRA, Angers
Professeur – Université de la Réunion
Chercheur – CIRAD, La Réunion
Professeur – Institut Pasteur Paris
Chercheur-HDR – CIRAD, La Réunion

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse
Directeur de Thèse

Remerciements

Ce travail a été financé par le Conseil Régional de La Réunion, le Fonds Social Européen et le CIRAD.

Aujourd'hui encore, on m'a dit que si j'en étais à écrire les remerciements, c'est que mon travail de rédaction en est à sa fin. C'est sûrement vrai, mais je serai convaincue que c'est vraiment terminé lorsque ce manuscrit sera entre les mains de qui de droit.

Donc tout d'abord, merci à Olivier Pruvost, mon directeur de thèse de m'avoir fait confiance pour ce projet de thèse. Merci d'avoir su m'orienter tout au long de ces années qui n'ont pas toujours été tranquilles. Sans la qualité de ton encadrement scientifique, ta motivation ponctuée de ton humour, ce travail de thèse ne serait pas.

Merci à Lionel, tuteur et correcteur au moment où j'écris ces lignes. Ta complémentarité scientifique mais aussi humaine avec Olivier a permis à ce travail de thèse de bénéficier d'un encadrement bicéphale de choc, et il est souvent bon, pour un doctorant de se savoir entre de bonnes mains. Je n'ai jamais manqué de conseils, de suggestions, ni même d'enzymes et compte tenu de l'éloignement géographique de la Réunion, autant dire que c'est un exploit.

Merci à Patrick Grimont d'avoir bien voulu être co-directeur de cette thèse et pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité BBPE de l'Institut Pasteur. Cette phase parisienne de ma thèse a sans aucun doute été la plus laborieuse du point de vue des expérimentations. Mais à aucun moment, tu ne m'as laissée tomber avec mes petits *Xanthomonas* qui ne voulaient pas pousser. Tu es aussi celui qui me connaît depuis ma maîtrise, et je dois dire que sans toi, je n'aurais jamais su qu'une thèse à la Réunion cherchait un candidat. Ceci entraînant cela, tu as finalement été l'initiateur de bien des choses dans mon cheminement dans la recherche.

Merci à Wafa Achouak et Charles Manceau pour avoir bien voulu être les rapporteurs de cette thèse.

Merci à Sylvain Brisse de l'Institut Pasteur et Xavier Nesme de l'Université Claude Bernard de Lyon pour leur participation à mon comité de thèse et pour tous leurs conseils judicieux.

Merci à Gabriel Taffin de Tilques, pour son écoute et son soutien.

Merci aussi à l'équipe de l'Unité BBPE, mon deuxième labo d'accueil : Martine, sans ton aide, mes hybridations n'auraient jamais pu se faire. Merci à Virginie, Laure, Sylvie, Françoise, Francine, Valérie, Ingrid, François-Xavier, Brigitte et tant d'autres encore pour votre accueil chaleureux et vos sourires. Merci à Cindy, Alexis, Anna, Dalèle, compagnons thésards, qui m'ont soutenue par leur compagnie pendant mon escapade parisienne, et surtout pour leur humour et leur soutien lorsque tout allait de travers.

Merci également à Claude Rouch, et à toute l'équipe du LBGM (Bernard, Maya, Christian, Emmanuel, Christophe, Alexandre, Jessica, Marjolaine, Evelyne...) pour m'avoir accueillie en tant qu'ATER. Ça a été un très grand plaisir de découvrir votre équipe, de travailler avec vous. De vous avoir connu cette année m'a donné une grande bouffée d'air frais.

Un grand merci à Claudine Boyer, et à Karine Vital pour leur aide technique durant cette thèse. Merci aussi à toute l'équipe de techniciens du CIRAD 3P : Annie, Emmanuelle, Florence, Muriel Magalie, David, Katia, Jean-Jacques..., pour leur aide, leur soutien, leurs sourires...

Parmi ceux qui m'ont accompagnée d'une manière ou d'une autre pendant ce travail de thèse : Chantal, Magalie, Océane, Micheline, Claudie, André : « goni vide i tien pas debout' », merci pour ces bons repas. Mais aussi, Christophe (Lulu), Antoine...et tant d'autres.

Merci à Séverine, Lan, Pierre, Erwann, Pascal, Gaëlle, Fabrice, Pierre-François, Dominique, Aurélie, compagnons thésards que j'ai représenté d'une manière ou d'une autre.

Merci à tous les Autres : Sophie, Jaëla, Delphine(s), Ludo, Nico, Caro, Johann, Willy, Tony, Nath, Karin, Kenny, Philippe, Geoffrey, Karine, Emmanuel, Stéphanie, Hélène, Marion, Fred.

A Christian, Isabelle, Laurent, Jean-Michel, Michel, Jacques, Serge, Bernard, Xavier et tant d'autres.....

A ma famille, pour tout votre soutien au long de mes études, sans vous, je ne serai jamais arrivée jusqu'ici. Et puis je vous prépare le meilleur des remerciements pour le mois de novembre...

Enfin à Fred, le boss des analyses sous R et aussi mon compagnon, pour m'avoir soutenue scientifiquement, mais aussi au quotidien. Ton optimisme sans faille, ton humour, et tout ce que tu donnes m'a permis d'avancer toujours. Merci pour ta compréhension et pour ton soutien.

A Alexe, pardon pour mon manque de disponibilité, mais un jour peut-être tu liras cette ligne et peut-être, tu comprendras. Merci d'être là.

A toi qui n'es pas encore né mais qui es déjà bien là. Avoir une maman qui finit sa thèse ça ne doit pas être drôle, mais les dernières lignes sont en train d'être écrites, je pourrai enfin m'occuper de toi.

TABLE DES MATIERES

Chapitre I Introduction	9
1. Les Anacardiacees	9
1.1. Le manguier	9
1.2. L'anacardier	10
1.3. Le pistachier	12
1.4. Le prunier de Cythère	12
1.5. Le faux poivrier	13
2. Xanthomonas du manguier et des Anacardiacees	14
2.1. La maladie des taches noires du manguier.	14
2.2. L'agent pathogène de la maladie des taches noires du manguier	19
2.3. Xanthomonas isolés d'Anacardiacees	20
2.4. Diversité des Xanthomonas isolés d'Anacardiacees.	22
3. La taxonomie bactérienne	26
3.1. Notion d'espèce bactérienne	26
3.2. Méthodes de taxonomie phénétiques	28
3.3. Méthodes génétiques	28
3.4. Méthodes basées sur la phylogénie	33
3.5. Définition polyphasique de l'espèce	36
3.6. Vers une approche populationnelle de la taxonomie bactérienne ?	38
3.7. Taxonomie des bactéries phytopathogènes : le genre Xanthomonas	38
4. Interactions entre plantes et bactéries phytopathogènes	46
4.1. Entrée de la bactérie dans les tissus internes de la plante	46
4.2. Interactions entre la plante et la bactérie pathogène	47
4.3. Les déterminants du pouvoir pathogène	47
5. Problématique	49
Chapitre II Trois pathovars de Xanthomonas infectent les Anacardiacees	51
1. Problématique	51
2. Méthodologie	52
3. Résultats et discussion	52
3.1. Relations génétiques intrapathovar	52
3.2. Pouvoir pathogène et clarification de la classification en pathovar	53
3.3. Diversité génétique des souches de X. axonopodis pv. mangiferaeindicae	54
4. Conclusion	58
<i>Pathological variations within Xanthomonas campestris pv. mangiferaeindicae support its separation into three distinct pathovars that can be distinguished by AFLP</i>	59
<i>First report in Myanmar of Xanthomonas axonopodis pv. mangiferaeindicae causing mango bacterial canker on Mangifera indica L.</i>	83
Chapitre III Les pathovars mangiferaeindicae et anacardii font partie de la nouvelle espèce Xanthomonas citri	85
1. Problématique	85
2. Méthodologie	85
3. Résultats et discussion	86
3.1. AFLP et MLSA	86

3.2. Détermination de la position taxonomique	87
4. Conclusion	89
<i>Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to Anacardiaceae and their relatedness to different Xanthomonas species</i>	91
<i>Discussion générale</i>	107
<i>Références bibliographiques</i>	111

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : planche botanique de la mangue et du manguier	6
Figure 2 : planche botanique de l'anacardier	6
Figure 3 : planche botanique du pistachier.....	7
Figure 4 : planche botanique du prunier mombin.....	7
Figure 5 : symptômes sur feuille	15
Figure 6 : symptôme sur pétiole.....	15
Figure 7 : symptôme sur fruit	16
Figure 8 : chancres sur rameau.....	16
Figure 9 : cycle épidémiologique de la maladie des taches noires du manguier	18
Figure 10 : colonies de <i>Xanthomonas</i> isolés de manguier	19
Figure 11 : symptômes sur feuille d'anacardier	20
Figure 12 : symptômes sur noix de cajou.....	21
Figure 13 : neighbor-joining tree représentant la diversité mondiale du pathovar <i>mangiferaeindicae</i> par RFLP	25
Figure 14 : principe de base de l'hybridation ADN/ADN (152)	30
Figure 15 : schéma de l'hybridation ADN/ADN par la méthode de la nucléase S1 (156)	32
Figure 16 : détermination du T_m de l'homoduplex, de l'hétéroduplex et du ΔT_m (156).....	33
Figure 17 : principe de l'AFLP	36
Figure 18 : résolution taxonomique de techniques couramment utilisées, d'après Vandamme (1996) et Coenye (2005) (33, 185)	37
Figure 19 : classification du genre <i>Xanthomonas</i> proposée par Vauterin et al., suite aux travaux d'homologies ADN/ADN en 1995.....	44
Tableau 1 : production de mangues en 2004 (http://faostat.fao.org/)	9
Tableau 2 : production de noix de cajou en 2004 (http://faostat.fao.org/).....	11
Tableau 3 : production de pistaches en 2004 (http://faostat.fao.org/).....	12
Tableau 4 : évolution de la nomenclature de plusieurs pathovars de l'espèce <i>axonopodis</i>	42
Tableau 5 : annexe, souches de <i>Xanthomonas</i> utilisées pour l'étude AFLP du pathovar <i>mangiferaeindicae</i> (chapitre II)	129
Tableau 6 : annexe, souches utilisées pour l'étude taxonomique des <i>Xanthomonas</i> des Anacardiacees (chapitre III)	137



Figure 1 : planche botanique de la mangue et du manguiier



Figure 2 : planche botanique de l'anacardier



Figure 3 : planche botanique du pistachier



Figure 4 : planche botanique du prunier mombin

Chapitre I

Introduction

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1. Les Anacardiacées

Les Anacardiacées constituent une famille de plantes retrouvées communément dans les zones tropicales, subtropicales et méditerranéennes. Elle comprend environ 600 espèces regroupées en 75 genres botaniques. Certaines d'entre elles sont simplement ornementales, d'autres ont un intérêt économique pour leur bois (*Anacardium*, *Schinus...*), pour leur tanin (*Rhus*, *Cotinus...*) ou encore leur richesse en térébenthine (*Pistacia terebinthus*). Parmi les espèces d'Anacardiacées cultivées pour leurs fruits, on trouve :

- Le manguier (*Mangifera indica*, L.)
- L'anacardier ou noix de cajou (*Anacardium occidentale*, L.)
- La pistache (*Pistacia vera*, L.)
- Le prunier de Cythère (*Spondias dulcis* Foster, syn. *Spondias mombin* L. et *Spondias purpurea* L.)
- Le faux poivrier (*Schinus terebinthifolius*, Raddi)

1.1. Le manguier

Le manguier est un arbre aux feuilles persistantes pouvant atteindre une hauteur de 30 m et dont la survie peut aller jusqu'à une centaine d'années. Les fruits sont des drupes, dont la taille varie en fonction des variétés (Figure 1). La domestication du manguier a commencé il y a 4000 ans en Inde et dans la péninsule indochinoise, d'où il s'est propagé à l'époque des colonisations, aux 17^{ème}/18^{ème} siècles.

Inde	10 800 000 t
Chine	3 582 000 t
Thaïlande	1 700 000 t
Mexique	1 573 000 t
Indonésie	1 437 665 t
Pakistan	1 055 987 t
Production mondiale	27 188 620 t

Tableau 1 : production de mangues en 2004 (<http://faostat.fao.org/>)

De nos jours, la culture commerciale du manguier se situe essentiellement dans les zones tropicales mais aussi dans certaines régions subtropicales, telles que l'Espagne, la Floride, l'Afrique du nord ou le Japon. (62, 117). La mangue est la 7^{ème} production fruitière selon la FAO en 2004, c'est une denrée importante du régime alimentaire de certaines régions tropicales (117). L'Inde, la Chine, la Thaïlande, l'Indonésie et le Mexique sont parmi les gros pays producteurs de mangues, représentant 70% de la production mondiale de mangues (Tableau 1). Le plus gros pays exportateur de mangue est le Mexique, avec un marché d'exportation de 108 millions de \$US (<http://faostat.fao.org/>). Le manguier a été introduit à la Réunion au 17^{ème} siècle, aujourd'hui il est cultivé sur une surface de 400 hectares. C'est la 5^{ème} production fruitière avec près de 5 000 tonnes en 2004.

Maladies affectant le manguier

Différentes maladies ont été décrites sur le manguier. Ainsi, l'antracnose, causée par le champignon *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), est l'une des maladies les plus importantes affectant le manguier. D'autres maladies fongiques, telles que l'oïdium (*Oidium mangiferae*) ou la pourriture à *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) sont décrites (60, 62). Les maladies bactériennes peuvent aussi affecter sérieusement le manguier, telles que la maladie causée par *Pseudomonas syringae* pv *syringae* qui provoque des nécroses apicales, sans affecter les fruits. Cette maladie touche essentiellement des régions tempérées avec un fort taux d'humidité (Espagne, Israël). Une autre maladie bactérienne a été décrite en Amérique centrale, causée par une bactérie « *erwinia-like* » (44, 62, 128). Parmi les maladies d'origine bactérienne, la maladie des taches noires du manguier ou encore « Mango Bacterial Black Spot » est l'une des plus importantes, touchant la production fruitière. L'agent pathogène de cette maladie est une bactérie du genre *Xanthomonas* qui peut provoquer une sévère défoliation, la chute précoce des fruits et une altération de leur qualité, affectant ainsi les possibilités d'exportation (62). La maladie des taches noires du manguier influe sur la production de mangues, et les fruits des nombreux cultivars sensibles peuvent être infectés de 50% à 80%.

1.2. L'anacardier

Endémique de la côte nord-est du Brésil, l'anacardier a été introduit au 16^{ème} siècle par les Portugais dans leurs colonies d'Afrique et d'Asie. Les régions de culture de l'anacardier se trouvent essentiellement en zone tropicale humide, entre 15° et 25° Nord et Sud de l'Equateur (Brésil, Afrique, Asie...). C'est un arbre au feuillage touffu, au port

hémisphérique, pouvant atteindre 15 mètres de hauteur, souvent utilisé pour le reboisement (Figure 2). C'est une des Anacardiées qui présente également une forte valeur commerciale par son intérêt alimentaire et industriel. Ainsi, ses différentes filières sont très exploitées notamment en Inde, en Indonésie, au Mozambique, au Nigeria, au Sri Lanka, en Tanzanie et au Vietnam (Tableau 2).

Vietnam	825 696 t
Inde	460 000 t
Nigeria	213 000 t
Brésil	182 632 t
Indonésie	120 000 t
Tanzanie	100 000 t
Autres pays	364 145 t
Production mondiale	2 265 473 t

Tableau 2 : production de noix de cajou en 2004 (<http://faostat.fao.org/>)

La production mondiale de noix de cajou a fortement progressé ces dernières années, passant de 505 000 tonnes en 1984 à plus de 2 millions de tonnes en 2005. Les principaux pays producteurs sont le Vietnam, l'Inde, le Nigéria, le Brésil, l'Indonésie et la Tanzanie.

Les différentes filières d'exploitation de l'anacardier sont les suivantes :

- La production de noix de cajou ou « vrai fruit » de l'anacardier,
- La production de pomme de cajou, correspondant au pédoncule portant la noix de cajou elle-même, qui se développe jusqu'à atteindre la taille d'une poire, de couleur jaune à rouge vif.

La production de noix de cajou est à l'origine de deux filières distinctes. L'amande débarrassée de son péricarpe est consommée telle quelle ou bien de l'huile en est extraite à usage pharmacologique et cosmétique. Du péricarpe on extrait le baume de cajou (ou cashew nut shell liquid), liquide hautement caustique et toxique, destiné à l'industrie aéronautique.

Les maladies et ravageurs de l'anacardier

Les principales maladies de l'anacardier sont causées par des champignons phytopathogènes, tels que la rouille pulvérulente causée par *Oidium* sp. qui s'attaque aux fleurs de l'anacardier. Les conditions déclenchant une agression par ce pathogène seraient les mêmes que pour l'oïdium du manguier, avec possibilité de propagation de l'un à l'autre. Les attaques dues à *Oidium* sp. causent des dégâts importants en Afrique de l'Est. La maladie rose due à *Corticium salmonicolor* attaque les branches de l'anacardier, conduisant au dépérissement de celles-ci. Les semis peuvent être affectés par d'autres maladies fongiques telles que le *Pythium*, le *Fusarium*, le *Phytophthora*, et l'anthraxose (*Colletotrichum*

gloeosporioides). Parmi les maladies bactériennes, la seule répertoriée à notre connaissance est une bactériose à *Xanthomonas* causant des épidémies au Brésil.

Le moustique de l'anacardier, un insecte suceur de sève, (*Helopeltis anacardii*) est le principal ravageur qui touche la culture de la noix de cajou, causant de graves dommages aux fleurs. Il est présent en Asie du Sud-Est (Inde, Sri-Lanka), et en Afrique de l'Est (Tanzanie) (<http://www.unctad.org/infocomm/francais/anacarde/plan.htm>).

1.3. Le pistachier

Le pistachier est natif d'Asie Mineure, dans une zone allant des îles de la Méditerranée à l'ouest de l'Inde. La pistache est appréciée et cultivée depuis de nombreux siècles dans sa région d'origine. Les plants de pistachiers sont de petite ou moyenne taille, allant jusqu'à une quinzaine de mètres (Figure 3). Le pistachier est un arbre dioïque qui requiert un climat typiquement méditerranéen. Le fruit du pistachier est une drupe contenant une noix qui correspond à la partie qui est commercialisée (<http://www.uga.edu/fruit/pistacio.html>).

La production mondiale de pistache est de plus de 460 000 tonnes, dominée par l'Iran, suivi des Etats-Unis, de la Syrie, de la Chine et de la Turquie (Tableau 3).

Iran	190 000 t
Etats-Unis	157 397 t
Syrie	40 000 t
Chine	32 000 t
Turquie	30 000 t
Autres pays	17 237 t
Production mondiale	46 6634 t

Tableau 3 : production de pistaches en 2004 (<http://faostat.fao.org/>)

1.4. Le prunier de Cythère

Le prunier de Cythère est un membre moins connu de la famille des Anacardiaceae, est originaire de la Mélanésie et de la Polynésie et a été introduit dans les zones tropicales de vieux monde et du nouveau monde. Commun dans des jardins en Malaisie et en Inde, il est cultivé dans certaines régions de l'Australie, à Cuba, en Haïti, en République Dominicaine, de Porto Rico à Trinidad, mais aussi en Amérique Centrale, au Vénézuéla, au Surinam... (http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/ambarella_ars.html).

L'arbre peut atteindre 10 m et se développe de préférence dans un climat tropical et subtropical humide. Les fruits se présentent en bouquet et sont de forme ovale, avec une peau mince et résistante. A maturité, ils prennent une couleur jaune dorée, avec une chair

ferme et juteuse les premiers temps, plus molle et plus parfumée par la suite. Les fruits sont caractérisés par un noyau à fibres raides (Figure 4).

En Indonésie, les feuilles du prunier de Cythère sont attaquées par un ravageur, *Podontia affinis*. Au Costa Rica, le tronc est attaqué par une guêpe, causant la nécrose et la mort du plant (http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/ambarella_ars.html).

1.5. Le faux poivrier

Le faux poivrier est un arbuste envahissant, toujours vert, de 2 à 4 mètres, commun dans toutes les Mascareignes et dans les régions tropicales. Les fruits, en mai-juillet, font au bout des branches, des bouquets de baies roses, de la grosseur d'un grain de poivre. La pulpe intérieure, rose résineuse, contient une graine ressemblant à une lentille (<http://www.flore-reunion.com/>). Appelé aussi arbre-encens, il fut rapporté du Bengale en 1767 à Maurice puis du Brésil à La Réunion en 1843. Les fruits sont généralement utilisés en gastronomie comme un succédané de poivre, et sont connus sous le nom de « baies roses ». Des tonnes de ces « baies roses de Bourbon », ont été exportées à partir de 1977 pour la Métropole et l'Amérique. (<http://www.flore-reunion.com/>). Le faux poivrier est souvent utilisé comme haie brise-vent autour des vergers, et notamment autour des vergers de manguiers à la Réunion. Cette Anacardiacee reste néanmoins une plante invasive des régions tropicales.

2. *Xanthomonas* du manguier et des Anacardiacées

Les Anacardiacées cultivées pour leurs fruits et ayant un intérêt agronomique voire industriel, sont couramment affectés, comme indiqué précédemment, par différentes maladies d'origine microbienne. Certaines de ces Anacardiacées sont particulièrement touchées par des maladies bactériennes à *Xanthomonas*, à l'instar du manguier, infecté par un *Xanthomonas* à l'origine de la maladie des taches noires du manguier. Du fait de l'importance de la culture du manguier à travers le monde, la maladie des taches noires du manguier (MTNM), ou encore « Mango Bacterial Black Spot » a été l'objet de différentes études sur son épidémiologie, sur la diversité phénotypique, mais aussi génétique de son agent pathogène. L'objectif de ces études a été surtout d'apporter des réponses sur cette maladie peu connue alors, mais qui est à l'origine de grandes pertes en terme de production fruitière.

En dehors du manguier, d'autres Anacardiacées sont infectées par des *Xanthomonas*, comme l'anacardier, le prunier de Cythère, le pistachier. Ces maladies sont pour le moment moins connues et l'agent pathogène, peu caractérisé.

2.1. La maladie des taches noires du manguier.

a. *Historique, répartition géographique*

La maladie des taches noires du manguier (MTNM) est la plus importante maladie affectant le manguier, due à une bactérie. La première description de la maladie date de 1909 par Doidge, en Afrique du Sud (45). Depuis, la MTNM touche différents pays de la zone tropicale et subtropicale : Australie, les Comores, l'Inde, le Japon, la Malaisie, l'île Maurice, la Nouvelle Calédonie, le Pakistan, les Philippines, la Réunion, Taiwan, la Thaïlande, et les Emirats Arabes Unis (6, 10, 28, 51, 58, 102, 113, 136).

b. *Description des symptômes*

Toutes les parties aériennes du manguier sont affectées par la maladie des taches noires du manguier avec des symptômes plus fréquents sur les feuilles et les fruits. La maladie provoque la nécrose des parenchymes superficiels. Elle est non vasculaire, et se répand de proche en proche dans les tissus à partir du point d'inoculation. Les symptômes consistent donc en des taches nécrotiques qui peuvent confluer lorsque l'infection est grande (60, 62)

Sur feuille

Les symptômes précoces sont des taches huileuses en forme de polyèdre. Les symptômes avancés sont nécrotiques de couleur noire, en relief et visibles sur les deux faces de la feuille (Figure 5). Les taches noires sont entourées d'un halo chlorotique. En vieillissant, les taches prennent une coloration brun chocolat puis gris cendré (60, 62, 136).



Figure 5 : symptômes sur feuille

Les symptômes sur pétioles (Figure 6) sont plus rarement observés et ont l'aspect de plaques huileuses se transformant en chancres (136). Une synthèse d'éthylène peut être provoquée par un grand nombre de lésions sur feuille, entraînant son abscission (136).



Figure 6 : symptôme sur pétiole

Sur fruits

Les taches sur fruits initialement huileuses et localisées au niveau des lenticelles évoluent vers des taches noires en relief jusqu'à 10 mm. Puis des craquelures cratériformes apparaissent, d'où s'écoule un exsudat gommeux fortement infectieux (Figure 7). Des lésions secondaires apparaissent le long des coulures de l'exsudat. Ces lésions entraînent la chute prématurée des fruits et induisent une forte dépréciation de la valeur commerciale des fruits (60).

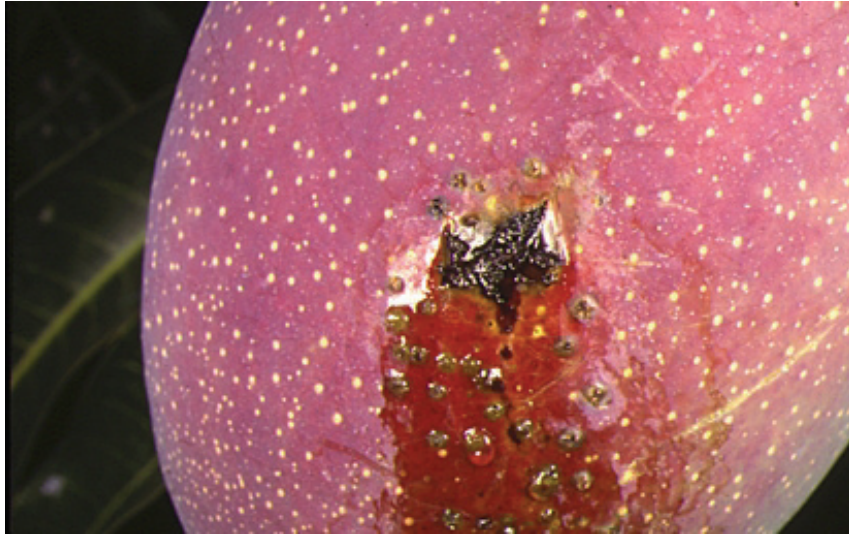


Figure 7 : symptôme sur fruit

Sur rameaux, bourgeons, et fleurs

Les symptômes sur rameaux sont rares sauf pour les variétés les plus sensibles, ou après un événement climatique qui favorise l'infection par la maladie. Ces symptômes sont retrouvés plus fréquemment sur les pousses herbacées, sous la forme de taches huileuses oblongues se transformant en chancres noirs.

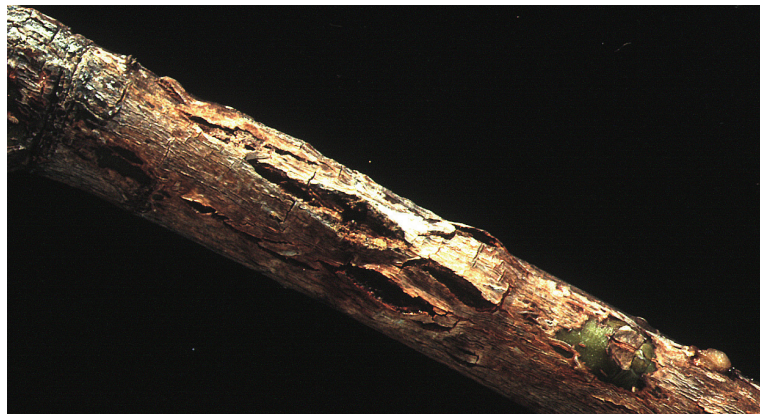


Figure 8 : chancres sur rameau

Plus rarement, les bourgeons se dessèchent et prennent une coloration brune. Les symptômes sur fleurs sont rarement observés en conditions naturelles, cependant, des taches huileuses devenant noires peuvent apparaître après inoculation artificielle (60, 133, 136)

c. Dissémination et moyens de lutte

Les activités humaines sont la cause principale de la dissémination de la maladie. Ainsi au sein des pépinières, le prélèvement de greffons à partir de pieds mères portant la maladie, une forte densité de plants et une irrigation par aspersion favorisent la dissémination de la bactérie sur les jeunes plants. Des organes apparemment sains, destinés à la multiplication, sont commercialisés parfois à grande échelle, permettant la dispersion de la maladie d'une région ou d'un continent à l'autre. Une fois les arbres plantés, le passage d'engins agricoles et l'utilisation d'outils préalablement contaminés non désinfectés d'un arbre à l'autre et l'aspersion de l'eau d'irrigation peuvent être aussi à l'origine d'une dissémination de la maladie au sein des vergers (60). D'autre part, les facteurs naturels ont aussi un rôle dans la dissémination de la maladie. Les événements climatiques, associant de la pluie et du vent tels que les cyclones et les tempêtes, peuvent créer des blessures au niveau des différents organes de la plante, favorisant ainsi l'infection par l'agent pathogène de la maladie. Ces facteurs naturels sont aussi à l'origine de la propagation de l'inoculum d'un arbre à l'autre (Figure 9). De manière plus simple, le transport de l'inoculum et sa dispersion à l'échelle de l'arbre ou de la pépinière peuvent être induits par de simples pluies verticales (60, 62, 133).

Le moyen le plus efficace contre la maladie des taches noires du manguier est l'éradication de tous les arbres malades. Mais cette solution est impossible à mettre en œuvre dans les régions où la maladie est endémique et où l'on retrouve des manguiers dans des jardins ou à l'état sauvage. De plus, le coût de l'éradication serait difficile à supporter dans les pays non développés. La lutte contre la maladie passe par trois principaux moyens : l'élimination des sources d'inoculum, une diminution de la dissémination et une réduction de la sensibilité des organes. Ces différents moyens de lutte non radicaux possibles doivent être combinés pour être efficaces et maintenir la maladie en dessous du seuil de nuisibilité économique (60).

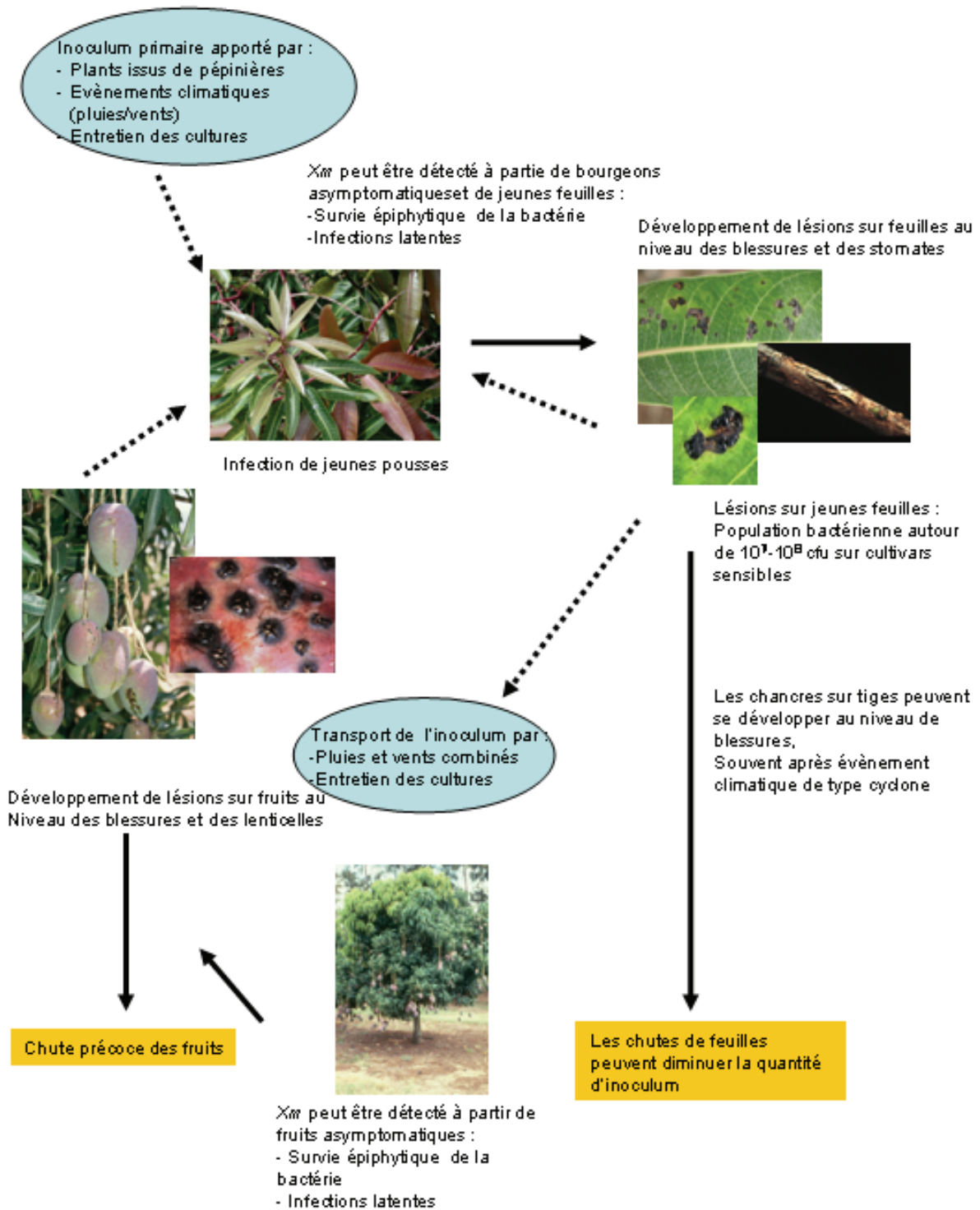


Figure 9 : cycle épidémiologique de la maladie des taches noires du mangoier

Les lignes en pointillé représentent la redistribution de l'inoculum, les lignes pleines représentent l'évolution et la conséquence de la maladie sur les différents organes de la plante

2.2. L'agent pathogène de la maladie des taches noires du manguier

a. Description générale de la bactérie

L'agent pathogène à l'origine de la maladie des taches noires du manguier est une bactérie à Gram négatif classée parmi le genre *Xanthomonas*, dont elle possède toutes les caractéristiques à l'exception de la pigmentation blanc-crème (Figure 10) de ses colonies (105). Cependant, certaines souches isolées de manguier au Brésil, en Floride, en Afrique du Sud et à la Réunion peuvent former des colonies de couleur jaune (61, 62).

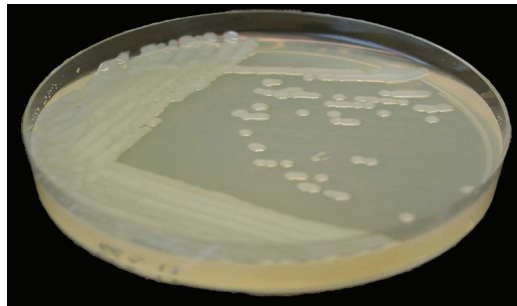


Figure 10 : colonies de *Xanthomonas* isolés de manguier

b. Taxonomie de l'agent pathogène de la maladie des taches noires du manguier

La bactérie est probablement originaire de l'Inde car elle a été retrouvée dans des échantillons d'herbier au Bihar datant de 1881. Elle a été caractérisée pour la première fois par Doidge en 1915 en Afrique du Sud sous le nom d'*Erwinia mangiferae* (45), puis dénommée *Pseudomonas mangiferae-indicae* (125, 126). À partir des années 1970, la bactérie est classée au sein du genre *Xanthomonas*, sous le nom de *Xanthomonas campestris* f. sp. *mangiferaeindicae* (151). L'agent causal de la maladie des taches noires du manguier devient l'un des 141 pathovars de l'espèce *campestris*, sous le nom de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, en se basant sur des caractères phénotypiques, au moment où les critères de dénomination des bactéries phytopathogènes ont été établis (48).

En 1995, la reclassification des *Xanthomonas* effectuée par Vauterin *et al.*, basée sur une approche polyphasique comprenant entre autre des hybridations ADN/ADN, n'a pas inclus le pathovar *mangiferaeindicae* (187). De plus aucune étude taxonomique récente sur les *Xanthomonas* ne s'est penchée sur le positionnement d'espèce de cette bactérie, qui jusqu'à présent garde le nom provisoire de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*.

2.3. *Xanthomonas* isolés d'Anacardiacees

Le manguier est historiquement l'hôte le plus ancien de la maladie des taches noires du manguier, donnant ainsi son nom au pathovar *mangiferaeindicae* (48). Les plus sévères épidémies ont été décrites sur cet hôte dans toutes les régions du monde où le manguier est cultivé à l'exception du continent américain, de l'Afrique de l'ouest et du nord et des zones non tropicales ou subtropicales. Toutefois, des *Xanthomonas* formant des colonies blanches ont été isolées de manguier dans les régions nord, nord-est et sud-est du Brésil. Ces bactéries sont à l'origine de symptômes apparemment différents de ceux provoqués par l'agent pathogène de la MTNM (150). Sur manguier, des souches atypiques formant des colonies jaunes ont été décrites, notamment au Brésil, en Floride, en Afrique du Sud et à la Réunion. Cependant, ces souches sont peu pathogènes sur manguier après inoculation artificielle, et pourraient être des *Xanthomonas* opportunistes sur manguier (62).

a. *Sur anacardier*

L'anacardier est l'un des hôtes les plus anciennement décrit de la bactérie. En effet, déjà en 1948, Patel *et al.* (125) l'ont retrouvée sur cette Anacardiacee en Inde, mais les souches n'ont pas été conservées. Plus récemment, au Brésil, des épidémies importantes sur anacardier ont été répertoriées (43, 123).



Figure 11 : symptômes sur feuille d'anacardier

Les symptômes sur feuille sont des taches nécrotiques, anguleuses localisées près des nervures (Figure 11). Sur le vrai fruit (noix de cajou) on observe des taches huileuses devenant nécrotiques (Figure 12).



Figure 12 : symptômes sur noix de cajou

Le Brésil reste à l'heure actuelle le seul pays où l'on retrouve cette bactériose de l'anacardier.

b. Sur prunier de Cythère

Sur prunier de Cythère, une maladie causée par un *Xanthomonas* formant des colonies blanches a été répertoriée aux Antilles, et notamment en Martinique (155). Cette bactérie provoque un dépérissement sévère (« Bacterial dieback of ambarella ») à l'origine de l'arrêt de la culture commerciale de cette Anacardiacee dans cette île, du fait de la réduction de la production de fruits et de la mort des plants dus à la bactériose. Les souches isolées de prunier de Cythère peuvent induire des symptômes sur manguier uniquement par inoculation artificielle, mais avec une agressivité réduite. Les *Xanthomonas* du prunier de Cythère ne semblent pas représenter une menace particulière pour le manguier, ce qui explique pourquoi la MTNM n'est pas présente aux Antilles alors que les pruniers de Cythère sont fortement attaqués (62).

c. Sur faux poivrier

Une bactériose due à un *Xanthomonas* a été identifiée sur faux poivrier à la Réunion. Les symptômes sont des lésions sur feuille sous forme de taches noires. Sur manguier, l'inoculation artificielle de souches isolées de faux poivrier induit des lésions montrant que la

bactérie est aussi pathogène du manguier. Cependant, les tailles de populations bactériennes retrouvées dans des lésions sur manguier, induites par des souches de faux poivrier, sont bien inférieures à celles de populations de souches isolées de manguier, inoculées artificiellement sur leur hôte d'origine (60, 62).

d. Sur pistachier

Très récemment sur le pistachier, un dépérissement dû à un *Xanthomonas* formant des colonies jaunes a été décrit. A l'heure actuelle, des inoculations artificielles sur manguier de souches isolées de pistachier n'ont pas été effectuées, mais des études préliminaires par séquençage du gène de l'ARNr 16S de ces bactéries démontrent qu'elles seraient proches du « translucens-core » (53, 54). De ce fait, il est probable que l'agent pathogène causant cette bactériose du pistachier soit génétiquement distinct de *X. sp. pv. mangiferaeindicae*.

2.4. Diversité des *Xanthomonas* isolés d'Anacardiacees.

En plus de travaux concernant la biologie, l'écologie et l'épidémiologie de la bactérie, des études ont concerné sa diversité. Ces travaux, basés dans un premier temps sur des méthodes phénotypiques puis sur l'étude de la variabilité génétique au sein d'une collection de souches diverses, ont permis de mieux connaître la diversité et de comprendre les relations entre ces bactéries pigmentées ou non, de provenances diverses et isolées d'hôtes différents.

a. Caractérisation par méthodes phénotypiques

La diversité de l'agent pathogène de la maladie des taches noires du manguier a été préalablement étudiée par des techniques classiques reposant sur des caractères phénotypiques (137, 140) et sur des variations de profils enzymatiques (Multilocus Enzyme Electrophoresis ou MLEE) (171). Les profils métaboliques de souches non pigmentées isolées de manguier, prélevées dans 14 pays, de souches non pigmentées isolées de faux poivrier à la Réunion, de souches non pigmentées isolées de prunier de Cythère aux Antilles et de souches atypiques pigmentées isolées de manguier dans quatre pays différents ont été comparés. Pour la caractérisation de ces souches, les approches suivantes ont été utilisées :

- Tests biochimiques
- Profils d'utilisation de différentes sources de carbone (technique API et BIOLOG)
- Sensibilité à différents antibiotiques et aux sels de métaux lourds

Des souches non pigmentées isolées de manguier dans différents pays, des souches non pigmentées isolées de faux poivrier et de prunier de Cythère, ainsi que des souches atypiques (jaunes) isolées de manguier ont aussi été étudiées par MLEE. Trois systèmes enzymatiques (estérase, phosphoglucomutase et superoxyde dismutase) ont été utilisés pour caractériser ces différentes souches.

Les résultats issus de ces travaux sont concordants et ont permis de dégager les premiers éléments de la diversité des souches associées aux Anacardiacees et classées au sein du pathovar *mangiferaeindicae*.

Toutes ces données suggèrent que les souches « typiques » non pigmentées isolées de manguier dans différentes régions du monde (sauf Brésil) et que les souches isolées de faux poivrier à la Réunion sont similaires, sans distinction d'une zone géographique particulière.

Les isolats non pigmentés retrouvés sur manguier au Brésil par contre sont phénotypiquement différents des souches isolées de manguier dans les autres régions du monde, de même que les souches non pigmentées isolées de prunier de Cythère aux Antilles et les souches jaunes isolées de manguier dans différents pays, classées au sein du pathovar *mangiferaeindicae*.

b. Variabilité génétique des *Xanthomonas* associés aux Anacardiacees.

Les résultats issus d'une approche phénotypique de la diversité existante au sein du pathovar *mangiferaeindicae* (137, 140, 171) ont mis en évidence la large variabilité existante au sein de ces souches. Cependant, cette variabilité observée ne portait que sur un petit nombre de souches, la plupart étant très similaires entre elles (souches non pigmentées isolées de manguier dans l'Ancien Monde). Les travaux de Gagnevin *et al.* (60, 61), par une approche moléculaire, ont permis d'évaluer leur structure génétique. La variabilité génétique d'une collection de 127 souches isolées de manguier et de faux poivrier dans différents pays et sur différents hôtes, a été étudiée par RFLP (Restriction Fragments Lengths Polymorphism) en utilisant trois sondes moléculaires :

- Un groupe de gènes *hrp* cloné de *X. oryzae* pv. *oryzae* (111) qui met en évidence une faible variabilité au sein des souches non pigmentées isolées de manguier et faux poivrier dans l'Ancien Monde tandis que les autres souches s'en distinguent. Ces résultats sont concordants avec ceux mis en évidence par les méthodes phénotypiques

- Un gène d'avirulence *avrXa10*, cloné de *X. oryzae* pv. *oryzae* et qui fait partie de la famille de gènes d'avirulence *avrBs3*, qui est commune à plusieurs espèces de *Xanthomonas*
- Une séquence insertionnelle inversée répétée (IS1595) représentant fondateur de la famille IS1595, présente chez de nombreux genres bactériens. Des homologues de IS1595 sont présents chez d'autres pathovars de *Xanthomonas*.

Les profils obtenus grâce aux sondes *avr* et IS mettent en évidence l'existence d'un groupe de souches homogènes de pv. *mangiferaeindicae* typiques, isolées de manguier, non pigmentées. De plus, les sondes *avr* et IS permettent la répartition de ces souches dans quatre groupes correspondant à leur pays d'origine (61) (Figure 13). Le groupe A contient des souches ayant pour origine géographique la Réunion, l'Afrique du Sud, la Nouvelle Calédonie, Rodrigues et les Comores. Il s'agit donc d'un groupe de souches ayant des provenances diverses, et qui pourtant sont similaires, pouvant s'expliquer par une diffusion et une introduction récente de ces bactéries dans les pays concernés. Le groupe RFLP B est le plus hétérogène, contenant essentiellement des souches isolées en Asie. Celles-ci montrent la plus grande diversité génétique observée sur la collection de souches étudiées. L'Asie étant le pays d'origine du manguier, il se pourrait que la maladie provienne aussi de cette région, et qu'une co-évolution de l'hôte et de son pathogène sur une longue période soit à l'origine de cette grande diversité de souches asiatiques (60, 61). Le groupe C est divisé en trois sous-groupes (C1, C2, C3) correspondant à des zones géographiques distinctes. Ainsi, les souches de ces sous-groupes pourraient avoir été introduites dans différents pays et ensuite évolué de manière séparée. Le groupe D quant à lui contient toutes les souches de la collection qui ont été isolées de faux poivrier à la Réunion. Ces souches ne peuvent être différenciées que par *avr*-RFLP, suggérant une spécificité d'hôte liée aux gènes d'avirulence de la famille de *avrBs3*.

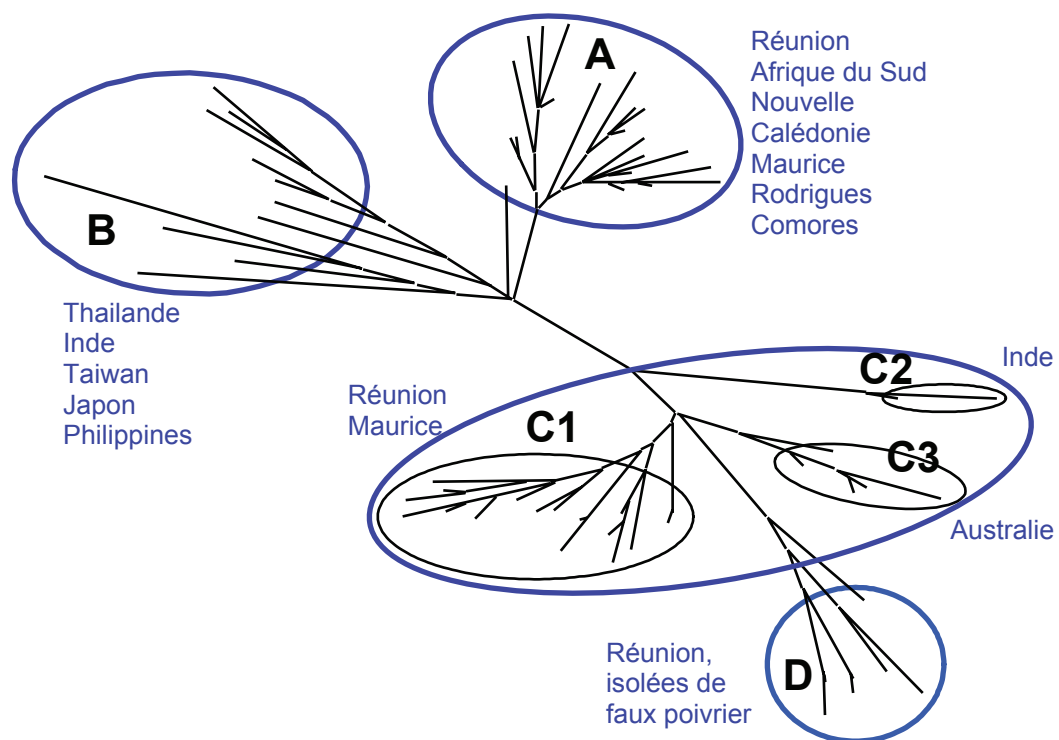


Figure 13 : neighbor-joining tree représentant la diversité mondiale du pathovar *mangiferaeindicae* par RFLP (61)

3. La taxonomie bactérienne

3.1. Notion d'espèce bactérienne

Les procaryotes apportent une grande contribution quantitative dans la biosphère et cependant, leur diversité et leur importance ont toujours été sous-estimées par les non microbiologistes. En effet, il n'y a que 5000 espèces procaryotes décrites et ce faible nombre est en partie dû au fait qu'il est souvent difficile d'isoler et de cultiver certains microorganismes. Or, obtenir des cultures pures est une des conditions indispensables pour la caractérisation et la reconnaissance d'une espèce procaryote. De même, l'existence des organismes procaryotes n'est connue que depuis quelques siècles et ainsi, la classification des procaryotes est relativement récente, mais aussi plus dynamique que les autres classifications d'organismes vivants (153).

L'espèce bactérienne constitue le maillon essentiel de la classification bactérienne. Une espèce biologique est définie comme étant une communauté d'êtres vivants reconnaissables par leurs caractères et capables de se reproduire sexuellement entre eux en donnant naissance à une descendance fertile. Or, la simplicité des microorganismes ne permet pas de définir une espèce en ne se reposant que sur la description de traits morphologiques comme c'est le cas pour les eucaryotes. Il a donc fallu développer différentes techniques pour obtenir différents traits phénotypiques et génomiques informatifs, afin d'obtenir un schéma taxonomique fiable des procaryotes et pouvoir définir des espèces.

Les différents critères permettant d'évaluer la parenté entre souches bactériennes ont souvent varié dans le temps. Il est cependant possible de distinguer quatre grandes périodes, correspondant à quatre « courants » de la taxonomie bactérienne qui sont :

- La taxonomie phénotypique ou phénétique
- La taxonomie numérique
- La taxonomie génétique
- La taxonomie polyphasique

En fonction des critères considérés, la définition de l'espèce bactérienne peut varier. Aussi, différents comités internationaux ont été chargés de proposer une définition de l'espèce.

a. Définition de l'espèce bactérienne selon le « Comité de Wayne et al., 1987 »

Le Comité désigné en 1987 (192) a permis de donner une première définition phylogénétique de l'espèce bactérienne. Celle-ci se base sur des homologies ADN-ADN, permettant de définir des espèces génomiques (ou « genomospecies »). Ces espèces génomiques regroupent des individus ayant des relations ADN-ADN qui se traduisent à la fois par des valeurs d'hybridations supérieures ou égales à 70%, et une valeur de ΔT_m inférieure ou égale à 5°C. Les valeurs d'homologie sont sensiblement dépendantes des conditions opératoires (technique d'hybridation et stringence utilisées), à la différence des valeurs de ΔT_m (70). Une fois l'espèce génomique définie, il est possible de rechercher des traits phénotypiques permettant la distinction avec d'autres espèces génomiques (192).

b. Définition de l'espèce bactérienne selon le « Comité de Stackebrandt et al., 2002 »

En 2002, un autre comité a été désigné et chargé de réévaluer la notion d'espèce bactérienne, en tenant compte des avancées techniques réalisées dans l'étude de la systématique bactérienne (173). Les principales recommandations de ce comité pour définir des espèces bactériennes sont les suivantes :

- Maintenir les hybridations ADN-ADN (étude du pourcentage d'homologie, ΔT_m) comme méthode de référence pour définir une espèce génomique.
- Disposer de caractères fiables et faciles à mettre en évidence avant de nommer une espèce génomique.
- L'utilisation de techniques autres que les hybridations ADN-ADN (séquençage complet de génomes, séquençage de gène de ménage, AFLP, PFGE...) est encouragée par le comité, à la condition que les résultats obtenus soient comparables à ceux des hybridation ADN-ADN ; le développement de méthodes susceptibles de remplacer les hybridations ADN-ADN étant aussi encouragé par le comité.
- Inclure le séquençage du gène de l'ARNr 16S de la souche type pour toute description de nouvelle espèce.
- Déterminer la composition en G+C% pour la souche type de l'espèce type d'un nouveau genre.
- Utiliser plusieurs souches pour la description d'une nouvelle espèce.

3.2. Méthodes de taxonomie phénétiques

a. Analyses phénotypiques classiques

Depuis la classification proposée par Cohn en 1872 (153) et jusqu'aux années 1960, la taxonomie bactérienne reposait essentiellement sur une classification phénotypique (tests phénotypiques classiques), constituant la base de la description formelle des taxons. Toutefois, une classification se basant sur des caractères phénotypiques a pour inconvénient de ne rendre compte que d'une quantité réduite d'information. De plus, le choix des critères considérés est subjectif, variant en fonction de l'auteur, source d'instabilité.

b. Taxonomie numérique

Initiée en 1753 par le botaniste français Adanson, et développée sur les bactéries par Sneath en 1957, la taxonomie numérique ou adansonienne repose sur l'étude de plus d'une centaine de caractères (morphologiques, biochimiques, culturels, structuraux...) pour chaque souche. Les individus sont alors rassemblés dans des classes de similitude, le plus généralement en calculant un indice numérique, correspondant à un coefficient de similitude ou à une distance taxonomique. Bien que les comités internationaux (173, 192) ne basent pas la définition de l'espèce sur ces critères, ceux-ci doivent être pris en compte pour la description d'une nouvelle espèce. De plus, la taxonomie numérique, à travers la très grande quantité de différents caractères considérés met en évidence une très large gamme d'information génétique disponible.

c. Chémotaxonomie

Les techniques de chémotaxonomie reposent essentiellement sur l'analyse des composants cellulaires de la bactérie. Ainsi, l'étude des peptidoglycanes contenus au niveau de la membrane cellulaire mais surtout l'analyse des profils d'acides gras de la membrane (lipopolysaccharides) ont été largement utilisés à des fins taxonomiques (186). Le contenu cytoplasmique (les isoprénoïdes quinones, les polyamines) ou l'analyse des protéines totales de la cellule bactérienne par électrophorèse SDS-PAGE ont prouvé leur grande fiabilité dans la comparaison et le regroupement de nombreuses souches taxonomiquement proches (186).

3.3. Méthodes génétiques

Développées à partir de la moitié du 20^{ème} siècle grâce à une meilleure connaissance des propriétés de la molécule d'ADN et à un développement des techniques de biologie

moléculaire, les méthodes génétiques dominent la taxonomie moderne car elles reflètent surtout les relations entre individus directement inscrites au niveau de leur patrimoine génétique.

a. Détermination du pourcentage en G+C

La première technique utilisée se basant sur des acides nucléiques a été la détermination du G+C% (153). La structure en double brin de l'ADN d'un organisme implique une complémentarité de ces bases : G-C et A-T. La teneur relative en base [G+C] / [A+T] peut varier d'un génome à l'autre, mais il reste constant pour les individus d'une même espèce. Le contenu en base d'un ADN est exprimé par la détermination du G+C%, dont la formule est la suivante :

$$G+C = [G+C] / [A+T+C+G] \times 100$$

Chez les bactéries, le contenu en G+C varie entre 25% et 75% (186) et les organismes sont d'autant plus distants que la différence entre leur G+C% est importante. Actuellement, des bactéries dont le G+C% diffèrent de plus de 5% sont considérées comme n'appartenant pas à la même espèce. Toutefois, la détermination de la teneur en bases ne reflète pas nécessairement la filiation entre les organismes, car celle-ci dépend surtout de la disposition des bases au sein de la molécule d'ADN.

b. Similarités ADN/ADN (hybridation ADN/ADN)

L'ADN d'une bactérie donnée est caractérisé par la longueur de la molécule, sa composition en bases, et sa séquence nucléotidique. Les hybridations d'acides nucléiques ont été possibles suite à la découverte de leurs propriétés de dénaturation et renaturation (106). Ainsi, les brins complémentaires d'un ADN en solution se séparent lorsque celle-ci est portée à ébullition (69). Cette dénaturation est caractérisée par le T_m (thermal denaturation midpoint, température de demi dénaturation de l'hybride) qui augmente en fonction du contenu en G+C% du génome considéré. La renaturation des deux brins d'ADN se produit suite à un refroidissement lent. Par contre, si la solution d'ADN est refroidie brutalement, les deux brins restent sous forme monocaténaire.

Reposant sur ces différentes propriétés de la molécule d'ADN, les hybridations ADN/ADN sont effectuées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux génomes bactériens différents. Il existe plusieurs méthodologies pour mesurer la similarité ADN/ADN qui utilisent toutes le même principe (Figure 14):

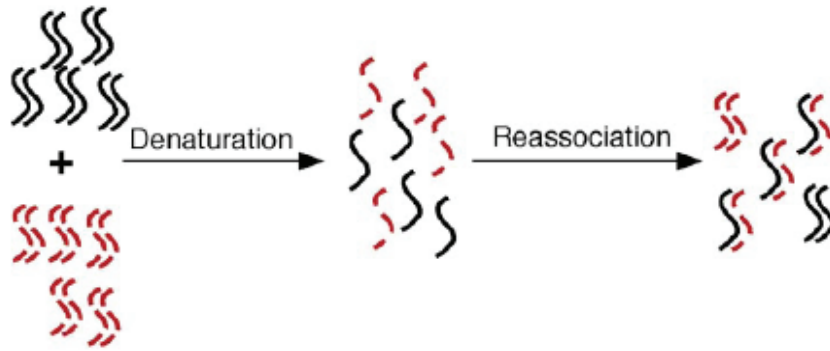


Figure 14 : principe de base de l'hybridation ADN/ADN (153)

Les méthodes les plus courantes sont :

- la méthode de renaturation optique (41),
- la méthode à l'hydroxyapatite (26),
- la méthode de la nucléase S1 (37, 69, 70).

Les hybridations par la méthode optique s'effectuent en mesurant au spectrophotomètre la renaturation des fragments d'ADN. L'avantage principal de cette méthode est qu'elle ne nécessite pas de marquage de l'ADN. De ce fait, elle ne permet pas la détermination du ΔT_m . De plus, cette méthode n'est pas taxonomiquement significative pour des valeurs de réassociations en dessous de 30% (69). Pour les autres techniques l'un des ADN à tester est marqué, en général radioactivement.

Par la technique à l'hydroxyapatite, les ADN simples brins et doubles brins sont adsorbés à l'hydroxyapatite dans un tampon phosphate à 0,10 M. L'adsorption de l'ADN à l'hydroxyapatite dépend de la molarité : lorsqu'elle est de 0,12 M à 0,14 M, les ADN simples brins sont élués ; lorsqu'elle atteint 0,4 M, tous les ADN sont alors élués. Ainsi, la radioactivité des différentes fractions (simples et doubles brins) peut être mesurée, permettant le calcul du pourcentage de réassociation. Les résultats sont alors normalisés et standardisés en fonction de la réassociation d'un ADN de contrôle et d'une réaction homologue (69).

Il existe deux méthodes à la nucléase S1 : la première par une collecte des ADN doubles brins par précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA) (37), l'autre par adsorption sur DEAE-cellulose (129). Pour la méthode que nous avons choisie (nucléase S1 et précipitation au TCA), la nucléase permet la digestion des ADN monocaténares après la réaction d'hybridation. Seuls les hybrides homologues et hétérologues sont conservés, et précipités au TCA, puis filtrés avant comptage de la radioactivité. Le bruit de fond dû aux réactions non spécifiques est estimé en hybridant de l'ADN de hareng avec l'ADN

radiomarqué. Ce bruit de fond est décompté de la radioactivité totale pour chaque hybride (Figure 15).

Les méthodes à l'hydroxyapatite et à la nucléase S1 analysent de l'ADN en solution libre, ce qui leur confère le grand avantage de pouvoir étudier la stabilité thermique de l'ADN réassocié ou ΔT_m . Le ΔT_m ou divergence correspond à la différence entre les T_m de la réaction homologue et le T_m de la réaction hétérologue (Figure 16) (25). Cette mesure permet d'évaluer la solidité et donc la spécificité des hybrides formés. La méthode hydroxyapatite et les deux méthodes à la nucléase S1 ont été comparées par Grimont *et al.* (69). Les principaux résultats issus de cette étude comparative montrent que ces méthodes donnent des valeurs de réassociation différentes, mais des valeurs de ΔT_m similaires. Ainsi, les valeurs de réassociation obtenues avec la méthode à la nucléase S1 sont plus faibles pour des génomes taxonomiquement distants. En effet, par la méthode hydroxyapatite il peut subsister des fragments monobrins qui normalement, avec la technique de la nucléase S1, sont automatiquement digérés. Ces fragments d'ADN simple brin pourraient être à l'origine d'une surestimation des valeurs de réassociation alors que le nombre d'hétéroduplexes diminue (69). La stringence de la réaction d'hybridation fait aussi partie des paramètres à prendre en compte. En effet, augmenter la température d'hybridation et/ou diminuer la concentration en sels du mélange d'hybridation permet d'augmenter la stringence de formation des hétéroduplexes. Elle est aussi liée au contenu en G+C des ADN à hybrider. Dans des conditions standard d'hybridation ADN/ADN, il est courant d'utiliser une température optimale de renaturation autour de $T_m - 20^\circ\text{C}$ à $T_m - 30^\circ\text{C}$, afin d'éviter une trop grande stringence de réaction (186).

Les deux comités de taxonomie (172, 192) recommandent l'utilisation des hybridations ADN/ADN afin de définir une espèce bactérienne ou encore « genomospecies ». A l'heure actuelle, cette technique est la seule technique de référence utilisée pour la définition de l'espèce bactérienne. Cependant cette technique reste assez lourde et longue à mettre en œuvre, demandant de très grandes quantités d'ADN, ce qui paraît difficile à obtenir pour des souches difficilement cultivables. Cette lourdeur opérationnelle interdit les comparaisons d'un grand nombre de souches deux à deux, ce qui ne permet pas de prendre en compte la diversité d'un groupe lors de son positionnement taxonomique.

Une approche plus polyphasique de la définition de l'espèce par l'utilisation croisée de différentes techniques de typage, et le développement de techniques visant à compléter et

à terme à remplacer les hybridations ADN/ADN sont largement encouragés par le comité de taxonomie de 2002 (172).

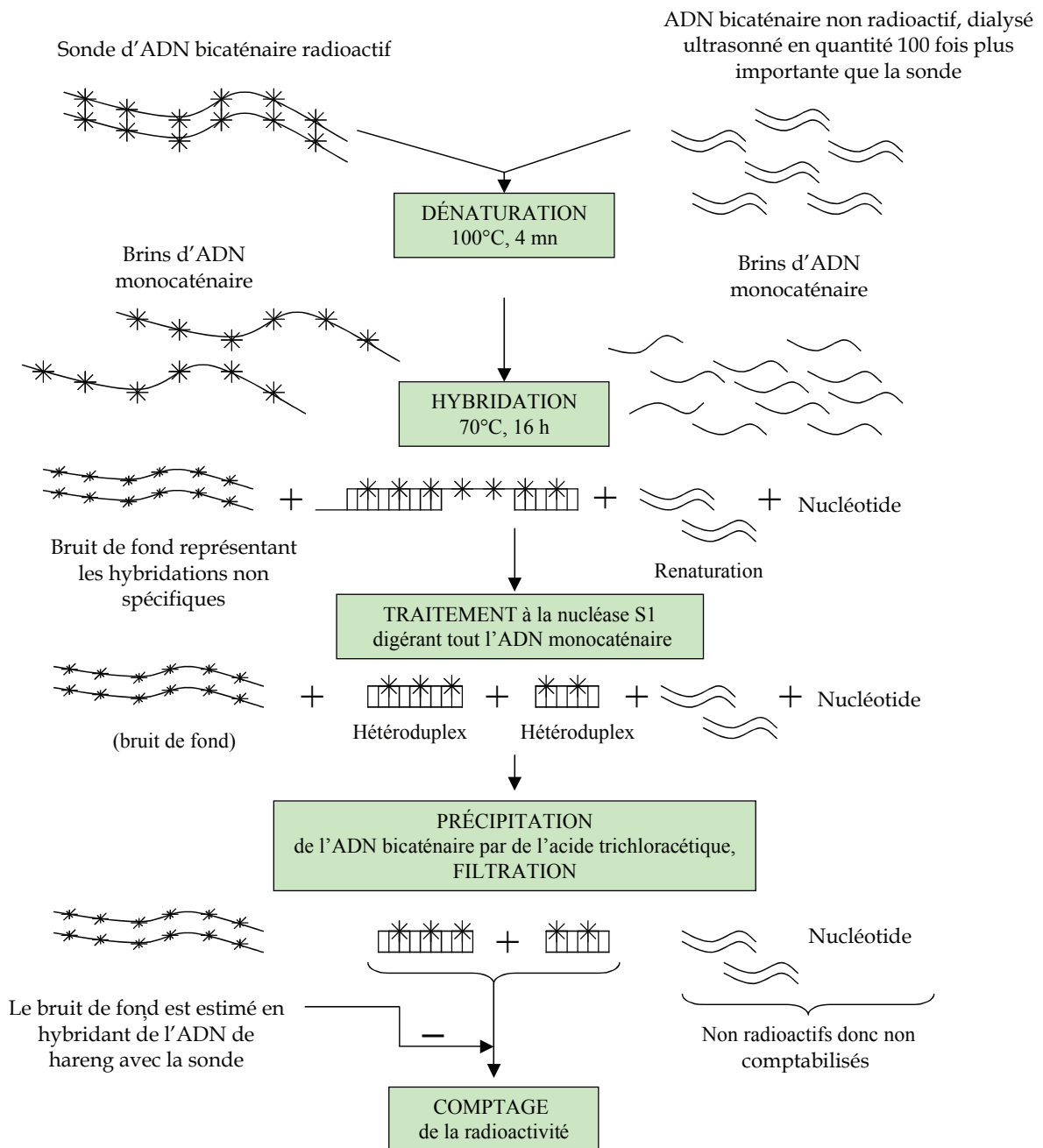
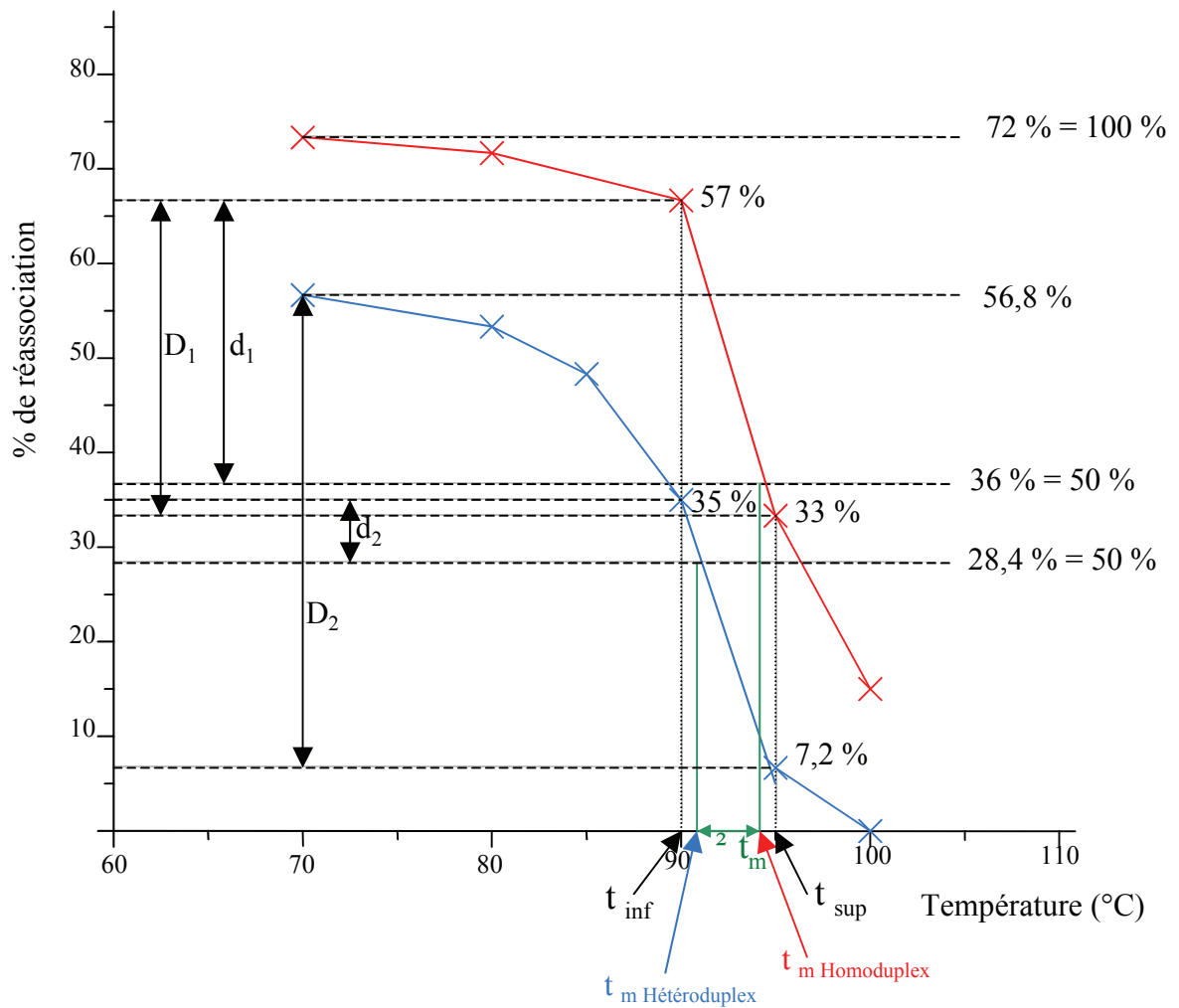


Figure 15 : schéma de l'hybridation ADN/ADN par la méthode de la nucléase S1 (157)



$$T_m \text{ homoduplex} = t_{inf} + t_{m \text{ homoduplex}}$$

Avec $t_{m \text{ homoduplex}} = (d_1/D_1) \times 5$

$$T_m \text{ hétéroduplex} = t_{inf} + t_{m \text{ hétéroduplex}}$$

Avec $t_{m \text{ hétéroduplex}} = (d_2/D_2) \times 5$

$$\Delta T_m = T_m \text{ homoduplex} - T_m \text{ hétéroduplex}$$

Figure 16 : détermination du T_m de l'homoduplex, de l'hétéroduplex et du ΔT_m (157)

3.4. Méthodes basées sur la phylogénie

Idéalement, une classification taxonomique doit représenter fidèlement la phylogénie des organismes. Ces dernières années, le développement de méthodes de séquençage et de typage a permis de reconstruire l'histoire phylogénétique des organismes en comparant les séquences ou les empreintes génétiques de leur ADN.

a. Séquençage du gène ARNr 16S

Au sein du génome les mutations synonymes n'ont pas d'effet sur le phénotype d'un organisme, mais leur rythme d'apparition est en théorie régulier dans le temps. Il est donc possible de construire un arbre phylogénétique des organismes sous certaines conditions (194). La condition la plus importante est de trouver des gènes qui accumulent des mutations au cours du temps, mais qui gardent une fonction constante. Ces gènes doivent aussi être homologues chez la plupart des organismes pour pouvoir être utilisés en phylogénie. Les gènes codants pour les ARN ribosomaux remplissent ces conditions et ont été largement utilisés en phylogénie et à des fins taxonomiques, en particulier le gène de la sous-unité 16S (193). Le séquençage de l'ADNr 16S est devenu un des standards de la taxonomie bactérienne, son utilisation étant recommandée pour la souche type d'une nouvelle espèce (173). Le seuil de 97% d'homologie de séquence a été défini : sous ce seuil deux souches n'appartiennent pas à la même espèce. Ces dernières années les progrès en terme de séquençage ont permis une utilisation de cette technique en routine, et les séquences de nombreuses espèces bactériennes sont organisées en bases de données et disponibles via internet. Cependant, le séquençage de l'ARNr 16S n'est pas toujours suffisamment discriminant pour délimiter certaines espèces bactériennes, du fait d'une trop grande homologie de séquence. Cette technique ne permet l'analyse que d'une partie très réduite du génome, ce qui ne reflète pas nécessairement toute l'histoire évolutive des souches étudiées.

Les séquences de l'ARNr 16S ont été largement utilisées pour reconstruire la phylogénie et définir la taxonomie à des niveaux supérieurs au genre. Ainsi, à partir de ces séquences Woese *et al.* ont pu reconstituer l'arbre du vivant (193) (194). Toutefois, cette approche par séquençage de l'ARNr 16S ne constitue pas un dogme, puisque que Gupta *et al.* proposent un modèle alternatif reposant sur des analyses multiloci de séquences d'acides aminés pour décrire la phylogénie des Procaryotes à un niveau supérieur au genre (73, 74).

b. Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

Idéalement, la comparaison de séquences nucléotidiques complètes de génomes serait la technique la plus informative pour déterminer les relations existantes entre les organismes. Les progrès en terme de séquençage ne permettent que l'analyse de portions du génome mais l'analyse d'un nombre suffisant de séquences bien choisies peut permettre de reconstituer des phylogénies congruentes avec celle de l'organisme en entier et de les utiliser à des fins taxonomiques. Récemment, le séquençage de gènes de ménage ou « housekeeping genes », qui assurent les fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules a été

largement utilisé pour le typage de différents genres bactériens. L'analyse combinée de plusieurs gènes permet de s'affranchir des cas d'histoire évolutive particulière (par exemple à cause d'une pression de sélection spécifique) ou de recombinaisons. Cette approche a été intitulée MLSA ou « multilocus sequence analysis » lorsqu'elle a pour objectif la reconstitution phylogénétique de l'histoire des organismes (66). Lorsque l'objectif est limité à l'identification de combinaisons alléliques pour le typage des bactéries (en général à des fins d'études épidémiologiques) on parle de « multilocus sequence typing » ou MLST (104). La méthode MLSA a déjà permis de résoudre les questions taxonomiques au sein de plusieurs genres bactériens (31, 67, 108, 118, 148, 178). Cette technique a l'avantage d'être rapide, utilisable sur de larges collections, demandant peu d'ADN, et les résultats peuvent être organisés en bases de données disponibles via internet. Toutefois, la délimitation d'espèces par MLSA est encore à l'étude. En effet, jusqu'à présent, cet outil s'est avéré utile pour résoudre les relations entre groupes qui correspondent à des espèces déjà nommées. Le problème majeur reste de pouvoir définir si les groupes de souches appartiennent à différentes lignées au sein d'une espèce, ou s'ils forment des espèces à part entière (76). Aussi à l'heure actuelle, la comparaison de données issues de séquences à des données issues de génotypage et d'homologies ADN/ADN est encore nécessaire, comme recommandé par le dernier comité de taxonomie (173).

c. Génotypage

La comparaison de souches à but phylogénétique et taxonomique peut être également faite à l'aide de techniques de génotypage qui permettent d'obtenir des données de type « fingerprint », c'est à dire la présence ou l'absence d'un grand nombre de marqueurs à partir desquels on peut comparer les souches deux à deux. Au départ la RFLP (Restriction Fragments Lengths Polymorphism) qui associe digestion enzymatique et hybridation avec une sonde ADN, puis les méthodes basées sur l'amplification génique (rep-PCR, RAPD...) ou sur la digestion enzymatique et l'amplification comme l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) offrent plusieurs avantages : universelles, rapides, hautement discriminantes, très informatives et permettant de caractériser de plus grandes collections de souches.

Les marqueurs générés par AFLP, dont le principe est détaillé dans la Figure 17, sont issus de l'amplification sélective de fragments de restriction, à partir d'ADN génomique (191).

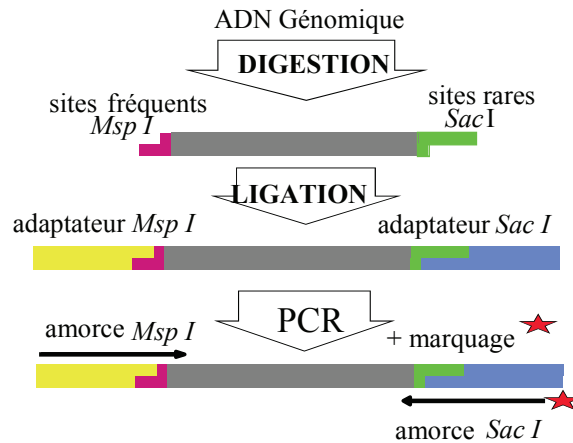


Figure 17 : principe de l'AFLP

Certaines techniques offrent le choix du marqueur ciblé (zones répétées ou régions sous sélection par exemple), d'autres sont entièrement aléatoires (et donc probablement neutres). Un autre avantage est que les plus performantes (comme l'AFLP) fournissent des marqueurs couvrant l'ensemble du génome et donc une information globale. En revanche ces techniques sont parfois lourdes, peu transférables d'un laboratoire à l'autre, nécessitent en général un témoin de référence systématique, posent des problèmes de partage de données entre laboratoires. Finalement l'interprétation phylogénétique des données de génotypage est loin d'être triviale. Malgré tout, plusieurs d'entre elles (rep-PCR, RAPD et AFLP entre autres) ont permis la résolution de questions taxonomiques du niveau de l'espèce ou de la sous-espèce chez un grand nombre de genres bactériens (78, 86, 88, 116, 142, 158). Ces méthodes de typage font partie des techniques dont l'usage et le développement sont recommandés par le dernier comité de taxonomie, afin de compléter ou de remplacer à terme, les homologies ADN/ADN (173)

3.5. Définition polyphasique de l'espèce

Les différentes définitions établies de l'espèce bactérienne (173, 192) tiennent compte d'une approche polyphasique de la taxonomie. Le terme de taxonomie polyphasique a été utilisé pour la première fois par Colwell en 1970 (36). Il est défini comme étant l'intégration de tous types d'informations disponibles sur les microorganismes étudiés (informations phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques) afin d'aboutir à une taxonomie plus « consensuelle » (186). Ainsi, toutes ces données sont récoltées et comparées afin de définir l'espèce bactérienne, même si la méthode de référence reste les homologies ADN/ADN. La

résolution des différentes techniques couramment utilisées (Figure 18) actuellement en taxonomie s'étend de la famille à l'identification d'une simple souche, la complémentarité des différents niveaux de résolution permettant de renforcer le pouvoir discriminant de ces techniques et d'alléger le travail en terme de difficultés techniques.

L'approche polyphasique a l'avantage de convenir aux taxonomistes. Toutefois, la définition de l'espèce est un concept qui a été remis en question ces dernières années (34, 35, 174) car actuellement, elle ne tient pas compte des concepts d'évolution, alors que la spéciation elle-même est un processus évolutif. Aussi, dans l'avenir, une définition de l'espèce au carrefour entre génétique et phylogénie devra sans doute être établie.

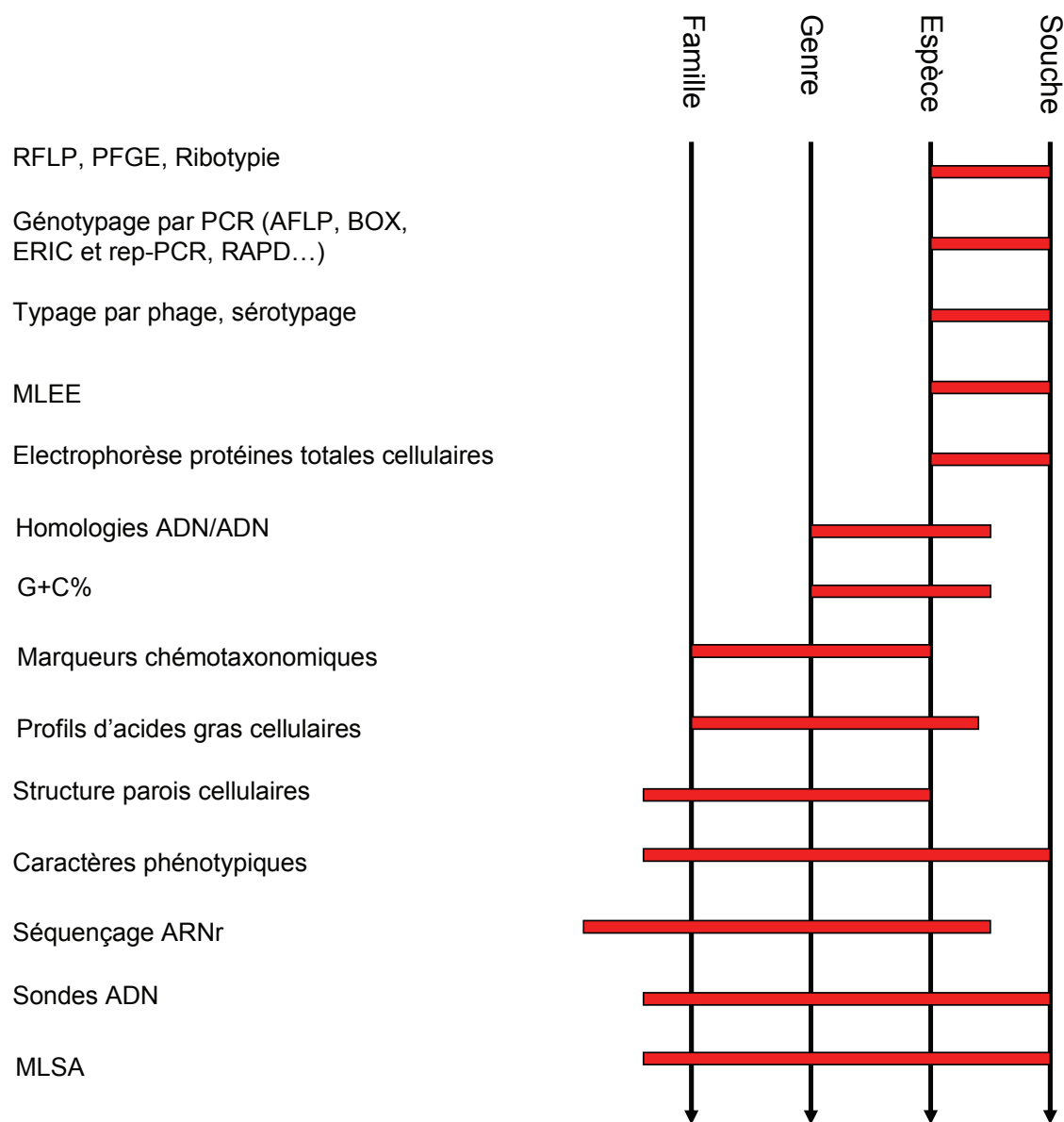


Figure 18 : résolution taxonomique de techniques couramment utilisées, d'après Vandamme (1996) et Coenye (2005) (33, 186)

3.6. Vers une approche populationnelle de la taxonomie bactérienne ?

La spéciation peut être considérée comme un processus de différenciation d'un organisme en des populations distinctes qui évoluent et divergent jusqu'à remplir les conditions pour être des espèces différentes. L'accumulation de mutations, synonymes et non synonymes, les réarrangements chromosomiques, les transferts horizontaux vont modeler les génomes et créer de nouveaux génotypes. Des événements tels que l'arrivée de nouveaux génotypes, la dérive génétique et la sélection naturelle vont quant à eux modeler la structure des populations. L'ensemble de ces forces peut aboutir à la différenciation des populations.

De nombreuses propositions visant à redéfinir le concept d'espèce bactérienne sous cet angle prenant largement en compte des mécanismes familiers du domaine de la génétique des populations ont été avancées ces dernières années (153) (97) (174). Ces concepts proposent tous de tenir compte des informations sur les mécanismes de microévolution apportées par les nouvelles méthodes moléculaires et de prendre en considération les données phylogénétiques. Toutefois Coenye *et al.* (33) considèrent que les forces évolutives précédemment décrites n'affectent pas de manière significative les méthodes génétiques classiques de définition de l'espèce (hybridation ADN/ADN, séquençage 16S rDNA). La mesure de la capacité pour deux génomes à former des hétéroduplexes n'est influencée que par la divergence de séquence et dans une moindre mesure, par transfert horizontal de gènes. Par contre les méthodes de typage (AFLP, BOX-, ERIC-, REP-PCR, RAPD...) sont plus à même d'apporter des informations sur l'évolution des génomes. Les techniques basées sur l'étude de séquences de gènes de ménage (MLST, MLSA) ou la comparaison directe de séquences totales de génomes bactériens restent les méthodes de choix pour une taxonomie tenant compte de l'histoire évolutive des microorganismes.

3.7. Taxonomie des bactéries phytopathogènes : le genre *Xanthomonas*

a. *Les premiers pas vers une taxonomie du genre Xanthomonas*

Les *Xanthomonas* appartiennent à la famille des Xanthomonadaceae, qui contient 12 genres, ordre des Xanthomonadales, au sein des γ -protéobactéries. Les bactéries du genre *Xanthomonas* sont mobiles par un flagelle polaire unique. Ce sont des bactéries aérobies strictes, qui forment des colonies lisses et mucoïdes. Les bactéries produisent un exopolysaccharide caractéristique, le xanthane, à l'origine de la consistance visqueuse des

colonies. Les colonies ont souvent une pigmentation jaune due aux xanthomonadines, mais certaines espèces peuvent être apigmentées (Exemple : certains *Xanthomonas* isolés des Anacardiacees) (161).

A cause de son importance économique, le genre *Xanthomonas* (47) a souvent été l'objet de nombreuses études taxonomiques. Ainsi, la taxonomie des *Xanthomonas* a évolué au gré des tendances générales et du développement de la taxonomie bactérienne. A la fin du 19^{ème} siècle, Wakker (1883) a décrit pour la première fois une infection à *Xanthomonas* (188). La grande diversité pathologique des *Xanthomonas* a ensuite conduit à la pratique du « new host-new species ». En effet, chaque nouveau variant montrant une gamme d'hôte différente ou une symptomatologie particulière était systématiquement classé en tant que nouvelle espèce du genre *Xanthomonas* (175). Suite à cette pratique, le nombre d'espèces a considérablement augmenté, conduisant à un genre complexe contenant plus d'une centaine d'espèces appelées aussi « nomenspecies ». Ainsi, un seul caractère phénotypique tel que le pouvoir pathogène pour une plante hôte donnée a joué un rôle crucial dans la classification taxonomique du genre *Xanthomonas* et dans la nomenclature qui lui est associée. Pour comprendre cette influence, il est nécessaire de rappeler les bases de la nomenclature bactérienne.

b. Nomenclature et notion de pathovar

La nomenclature ou la nomination n'est possible qu'en utilisant le « Code International de Nomenclature des Bactéries » (International Code of Nomenclature of Bacteria) (98). Ce code, dont la première version a été publiée en 1948, est régulièrement révisé et la dernière version date de 1990 (99). Le Code contient les règles et principes à suivre pour la nomenclature bactérienne et il est établi par le « Comité International de Systématiques des Procaryotes ou « International Committee on Systematics of Prokaryotes ». Ainsi, une nomenclature est considérée comme légitime si elle respecte l'ensemble des règles du code de nomenclature. De plus, en 1980, la nomenclature prend un nouveau départ avec la création des « Approved lists of bacterial names » (170). Cette liste a été établie après la révision de 1976 du Code. Seuls les taxons bien décrits, pour lesquels une nomenclature type est disponible (exemple, souche type pour un taxon donné), sont retenus dans cette liste.

Appliqué aux bactéries phytopathogènes, il devenait évident que l'utilisation du Code aurait entraîné le rejet de nombreux noms d'espèces. En effet, certaines espèces n'étaient différenciées que par leur pathogénicité, ce qui était un critère insuffisant d'après le

Code et peu des ces espèces pouvaient être séparées de l'espèce *X. campestris* ou n'étaient suffisamment distinctes les unes des autres par les tests biochimiques usuels, utilisés dans la huitième édition du Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Seuls cinq noms d'espèces du genre *Xanthomonas* ont donc été répertoriés au sein de la « Approved List of Bacterial Names » de 1980 (170) : *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. ampelina* (49).

Par la suite, il a été proposé une nomenclature spécifique pour les bactéries phytopathogènes qui ne rassemblaient pas tous les critères pour rester au rang d'espèce (197). Suivant cette proposition, la Société Internationale de Pathologie Végétale (« International Society for Plant Pathology ») établit les règles pour l'utilisation du terme de pathovar (48). Le but de l'utilisation du terme de pathovar était de donner une nomenclature au niveau infrasubspécifique pour des bactéries qui se distinguent essentiellement par leur pathogénicité.

Définition du pathovar d'après Young et al. (198)

Le terme de pathovar permet de distinguer des souches bactériennes appartenant au même taxon mais ayant une gamme d'hôtes différente et/ou induisant des symptômes différents sur un même hôte. Le terme de pathovar n'a aucune valeur taxonomique.

Cependant, le classement en pathovar est reconnu par les scientifiques car il repose sur une réalité biologique et semble bien adapté aux populations de *Xanthomonas*, qui possèdent une forte spécialisation du pouvoir pathogène. De plus, ce classement est essentiel d'un point de vue légal, car la notion de pathovar permet l'établissement de règles régissant les échanges internationaux de végétaux (ex : mise en quarantaine de certains organismes).

Suite à cette introduction du terme de pathovar, de nombreuses « nomenclatures » du genre *Xanthomonas* ont été reclassées en tant que pathovars de l'espèce *X. campestris*.

Au sein du genre, quelques changements interviennent : l'espèce *X. ampelina* est retirée du genre pour devenir *Xylophilus ampelinus* (42) et de nouvelles espèces sont intégrées au genre *Xanthomonas*, comme *X. populi* autrefois classée sous le nom d'*Aplanobacter populi* (149). Le genre *Xanthomonas*, suite à une étude de caractères phénotypiques sur une collection de 266 souches, est réorganisé en 8 espèces : *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. populi*, *X. oryzae* (autrefois *X. campestris* pv. *oryzae* (176)), *X. maltophilia*, *X. graminis* et *X. campestris*. Cette dernière est une espèce hétérogène contenant près de 140 pathovars différents (48, 183).

X. maltophilia, classée auparavant sous le nom de *Pseudomonas maltophilia* est intégrée au genre *Xanthomonas* en 1983, pour finalement être transférée au genre *Stenotrophomonas* (122), sur la base de données biochimiques et moléculaires.

c. *Apports de la taxonomie moléculaire*

Parmi les *Xanthomonas*, l'espèce posant le plus de problèmes est *campestris* dont de plus en plus d'études montraient l'hétérogénéité sans résoudre la question de classification et encore moins celles des relations phylogénétiques entre pathovars. En 1995, Vauterin *et al.* (187) formulent une reclassification du genre *Xanthomonas*, sur la base d'homologies ADN/ADN impliquant 183 souches. Cette étude montre que le genre est subdivisé en 20 groupes d'homologie ADN, dont quatre sont des espèces déjà décrites (Figure 19). Les 16 autres groupes sont issus de la reclassification de certains pathovars de l'espèce *X. campestris*. Des données de génotypage issues de BOX-PCR (conserved repetitive sequence), ERIC-PCR (Rnterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), et REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic), incluant un plus grand panel de souches (339 souches du genre *Xanthomonas*) ont pu être comparées aux travaux de Vauterin *et al.* (143). Les groupes identifiés sur la base de ces données de génotypage correspondent à ceux proposés par Vauterin *et al.* Toutefois, le groupe 9 (*X. axonopodis*), qui comporte beaucoup de pathovars appartenant autrefois à l'espèce *campestris*, apparaît plus hétérogène et se subdivise en 6 sous-groupes génétiques. Cette étude a aussi permis la classification au sein des groupes génomiques de plus de 160 souches non caractérisées par hybridation ADN/ADN.

Sur la base d'une taxonomie polyphasique comparant différentes techniques de typages à des données d'hybridation ADN/ADN, de nouveaux pathogènes ont été identifiés et rangés au sein du genre *Xanthomonas* : *X. cynarae*, pathogène de l'artichaut (181), *X. gardneri*, correspondant au groupe D des pathogènes décrits sur la tomate et les espèces *X. euvesicatoria* et *X. perforans*, toutes deux classées auparavant au sein de l'espèce *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (groupe A et groupe C) (91). De même, l'agent responsable du dépérissement bactérien de l'oignon a été décrit comme étant un nouveau pathovar de l'espèce *X. axonopodis* (*X. axonopodis* pv. *allii*) (157, 158).

d. *Une taxonomie entre dynamique et polémique.*

Depuis la reclassification effectuée par Vauterin *et al.* en 1995 (187), la taxonomie des *Xanthomonas* n'a cessé d'être l'objet de polémique en terme de nomenclature. En effet en 2000, Schaad *et al.* rejettent plusieurs noms d'espèces proposés par Vauterin *et al.* Le comité

de taxonomie de l'ISPPB démontre que les propositions de Schaad *et al.* ne reposent sur aucune autre expérimentation complémentaire visant à étayer son argumentation et sur une mauvaise interprétation du code imposant les règles à respecter en terme de nomenclature bactérienne (196). Celles-ci sont donc rejetées et les propositions de Vauterin *et al.* sont donc validées et toujours utilisées à l'heure actuelle.

D'autre part, la taxonomie de l'agent pathogène du chancre bactérien des agrumes et d'autres pathovars de l'espèce *axonopodis* a aussi été l'objet d'une polémique récente. Sur la base d'hybridations ADN/ADN, Schaad *et al.* (165) proposent un changement de nomenclature et l'élévation de *citri* au rang d'espèce dans laquelle sont rangés les pathovars *citri*, *aurantifolii*, *citrumelo*, *malvacearum*, *alfalfae* et *phaseoli* var. *fuscans* (précédemment appartenant à *axonopodis*). En opposition au pathovar, des sous-espèces ont été proposées (Tableau 4). Toutefois, suite à une erreur d'interprétation de la nomenclature, ces propositions de noms sont revues par la même équipe (164). Par exemple, leur proposition de nommer l'espèce *X. axonopodis* pv. *citri* en *X. smithii* subsp. *citri* s'avère être illégitime. En 1989, Gabriel *et al.* ont en effet déjà proposé d'élever l'agent pathogène du chancre bactérien au rang d'espèce (59) et le nom *X. citri* (ex Hasse 1915) a alors été proposé. Toutefois, cette proposition a été rejetée par manque d'expérimentations, et notamment, par manque de données d'hybridation ADN/ADN (195). Malgré tout, le nom proposé en 1989 reste valide et doit être réutilisé légitimement si des données complémentaires prouvent que le pathovar *citri* doit être ré-élevé au rang d'espèce, ce qu'ont fait Schaad et son équipe. Les autres propositions de nomenclature de Schaad *et al.* doivent aussi être modifiées, pour des raisons similaires. Très récemment, les espèces proposées par Schaad *et al.* ont été validées (52, 164), et les implications de la validation de ces espèces, mais surtout de la validation pour la première fois de sous-espèces au sein du genre *Xanthomonas* continue d'alimenter la polémique autour de ce genre bactérien.

Ancienne nomenclature <i>Xanthomonas campestris</i>	Nomenclature après 1995 <i>Xanthomonas axonopodis</i>	Propositions Schaad <i>et al.</i> (2005)	Propositions Schaad <i>et al.</i> (2006)
pv. <i>citri</i> (<i>citri</i> A)	pv. <i>citri</i> (9.5)	<i>X. smithii</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>
pv. <i>aurantifolii</i> (B/C/D)	pv. <i>aurantifolii</i> (9.6)	<i>X. smithii</i> subsp. <i>aurantifolii</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i>
pv. <i>citrumelo</i> (E)	pv. <i>citrumelo</i> (9.2)	<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelo</i>	<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>
pv. <i>malvacearum</i>	pv. <i>malvacearum</i> (9.5)	<i>X. smithii</i> subsp. <i>smithii</i>	<i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>
pv. <i>alfalfae</i>	pv. <i>alfalfae</i> (9.2)	<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>alfalfae</i>	<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>alfalfae</i>
pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> (9.6)	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>

Tableau 4 : évolution de la nomenclature de plusieurs pathovars de l'espèce *axonopodis*

e. Approche phylogénétique de la taxonomie des Xanthomonas

Les premières analyses phylogénétiques du genre *Xanthomonas* ont été effectuées à partir de l'étude de séquences de l'ARNr 16S, comme recommandé par les différents comités de taxonomie (173, 192). Ainsi, les travaux de Hauben *et al.* (79) ont démontré une très forte similarité de séquences entre les souches étudiées (98,2% en moyenne). Cette approche a permis de distinguer un groupe en particulier au sein du genre *Xanthomonas*, appelé « translucens-core » (contenant les espèces *X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. theicola* et *X. translucens*), à opposer à un groupe intitulé « *Xanthomonas*-core ». Toutefois, ces résultats mettent en évidence le faible pouvoir discriminant des séquences de l'ARNr 16S pour délimiter des espèces avec certitude au sein du genre *Xanthomonas*. Afin d'augmenter la résolution d'étude, des séquences de l'espace intergénique 16S-23S ou ITS, plus variables que les séquences de l'ARNr 16S (« intergenic space sequences ») ont été utilisées pour étudier la phylogénie de plusieurs espèces de *Xanthomonas* (68). Cette étude a permis d'améliorer le pouvoir discriminant par rapport à celui obtenu avec l'ARNr 16S, toutefois, beaucoup d'indéterminations subsistent.

D'autres gènes de ménage ont été séquencés pour l'étude des relations phylogénétiques entre les différentes espèces de *Xanthomonas*. Des données de séquences du gène *lrp* (leucine responsive protein) (38) ont été comparées à des données de génotypage, notamment pour comprendre les relations au sein de l'espèce *X. axonopodis* pv. *citri*. Récemment, des données de séquences de quatre gènes de ménage, comparées à des données issues d'AFLP ont été utilisées pour l'étude de populations de *X. arboricola* (23).

Avant la reclassification de 1995

Après la reclassification de 1995

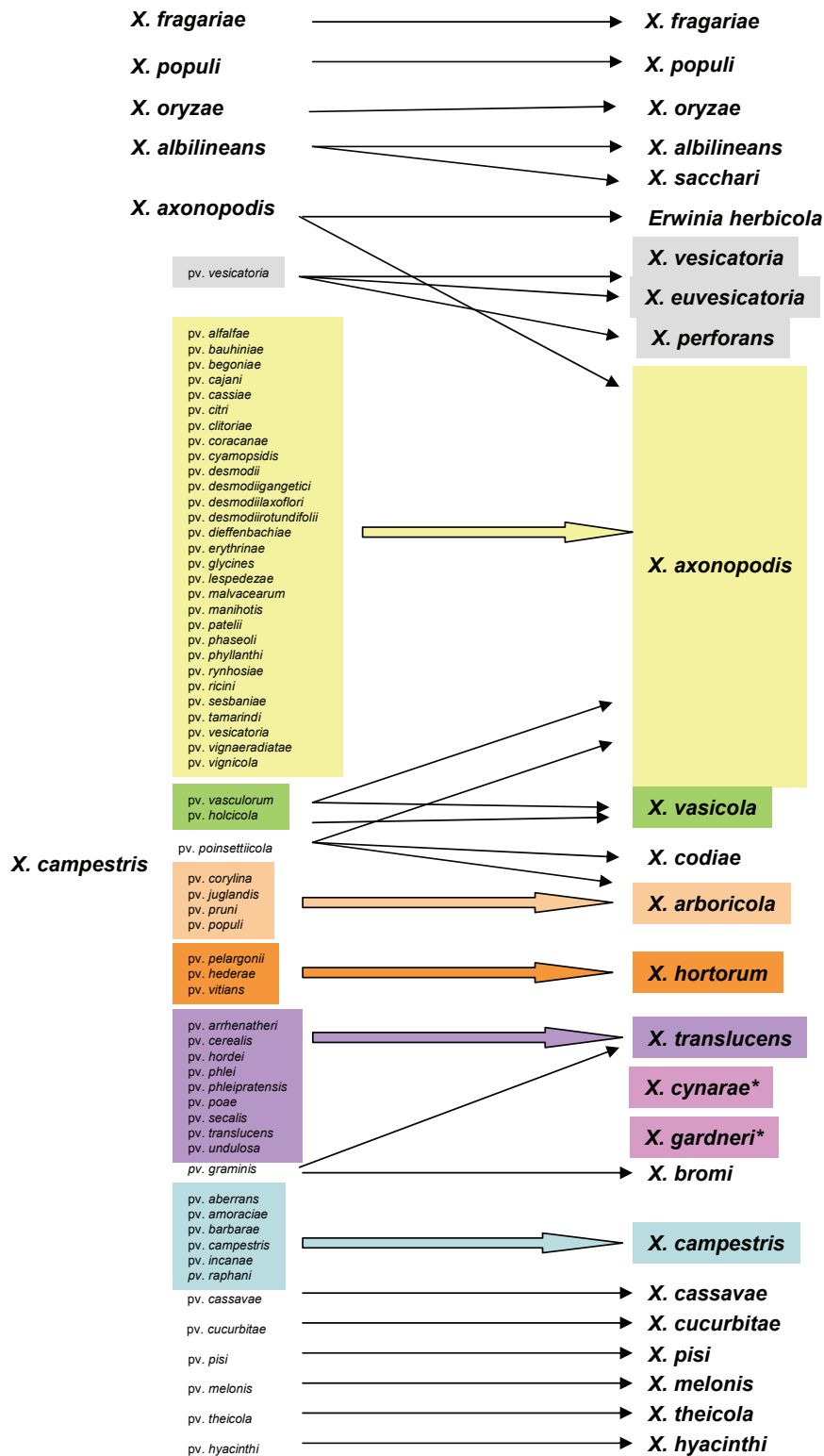


Figure 19 : classification du genre *Xanthomonas* proposée par Vauterin *et al.*, suite aux travaux d'homologies ADN/ADN en 1995

Les noms avec une * correspondent à des espèces nouvelles décrites après 1995, sauf espèces de Schaad (juin 2007) (91, 181).

f. Informations des séquences totales de génomes de *Xanthomonas*

Trois génomes entiers de *Xanthomonas* sont disponibles à l'heure actuelle : *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac), *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) (40) et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (101). D'autres projets de séquençage de génomes sont actuellement en cours d'achèvement. La comparaison du contenu en gènes entre Xac, Xcc et Xoo montre que plus de 80% des gènes sont conservés entre ces trois pathogènes. Toutefois, les chromosomes de Xac et Xcc ont une forte colinéarité, et seuls trois réarrangements majeurs ont été détectés. Le génome de Xoo n'est pas colinéaire avec ceux de Xac et Xcc, et la comparaison de ces génomes suggère de nombreux réarrangements depuis la divergence avec leur ancêtre commun. L'analyse de ces génomes suggère également qu'il existe de nombreux gènes spécifiques à chaque bactérie. Ces gènes sont le plus souvent regroupés dans des régions terminales de réplication, riches en éléments transposables, indiquant que ces gènes peuvent avoir été acquis par transfert horizontal. Ces gènes spécifiques à chaque génome sont pour la plupart impliqués dans le pouvoir pathogène. Parmi les gènes putativement impliqués dans des fonctions de virulence ou d'agressivité il existe plus de 80% d'homologie (entre Xoo et les deux autres *Xanthomonas*) suggérant l'existence d'un fond génétique commun lié au pouvoir pathogène et que c'est parmi les 245 gènes identifiés spécifiques de Xoo que l'on pourrait trouver ceux spécifiquement impliqués dans les particularités de son pouvoir pathogène (par exemple son spectre d'hôte ou sa symptomatologie). Le génome de Xoo est deux fois plus riche en éléments transposables que Xac et Xcc, éléments favorisant par leur nature les réarrangements chromosomiques (délétions, duplications, inversions et translocations) (101).

La disponibilité de ces génomes est aussi un atout majeur pour la connaissance des forces évolutives qui modèlent les génomes bactériens.

Avec l'avancée des techniques de séquençage, il serait à terme envisageable de baser des études en phylogénie sur des séquences totales de génomes, ce qui de loin serait des plus informatifs pour la connaissance des relations entre populations bactériennes. Cependant, des prérequis sont indispensables pour que cette approche soit robuste : entre autres une bonne compréhension de la plasticité des génomes (notamment les transferts horizontaux) et de leurs impacts évolutifs et phylogénétiques, des méthodes de génomique fonctionnelle permettant d'identifier rapidement le rôle de gènes qui différencient les taxons, amélioration des techniques permettant d'identifier l'effet des forces évolutives sur le génome.

4. Interactions entre plantes et bactéries phytopathogènes

En général, les microorganismes n'interagissent pas avec les plantes qui se trouvent dans leur environnement, les relations étant au mieux trophiques avec les plantes fournissant de manière indirecte les nutriments nécessaires aux bactéries. Les relations de type symbiotique se font à l'avantage plus ou moins réciproque de l'un et de l'autre. Toutefois, il arrive que certains genres bactériens soient capables de parasitisme, qui se fait au détriment de la plante hôte, allant jusqu'à la maladie sur une plante sensible, ou si la plante est résistante au détriment de la bactérie.

Le spectre d'hôte, qui représente l'ensemble des plantes sur lesquelles une bactérie pathogène peut causer une maladie, est en général très étroit chez *Xanthomonas*, à la différence de *Ralstonia solanacearum*, qui est un pathogène à large spectre d'hôtes. Le pouvoir pathogène d'un microorganisme est composé de deux notions importantes : la virulence, composante qualitative qui représente l'aptitude de l'agent pathogène à causer une maladie, et l'agressivité, composante quantitative, qui correspond à la quantité de maladie induite par un pathogène virulent (17). Dans ce type d'interaction à l'origine de maladie, l'enjeu pour la bactérie est de pouvoir s'introduire dans la plante hôte, d'y trouver les conditions nécessaires à sa multiplication, et de sortir de la plante pour infecter d'autres plantes. De même, pour la plante, il s'agira de détecter le pathogène suffisamment tôt pour l'isoler et l'empêcher de proliférer.

4.1. Entrée de la bactérie dans les tissus internes de la plante

Les bactéries n'ont pas la possibilité d'entrer dans la plante de manière active en traversant l'épiderme par hydrolyse des tissus (56). Aussi, différents mécanismes vont les aider à se mouvoir, à s'orienter soit vers des ouvertures naturelles (stomates, hydathodes, lenticelles) soit vers des blessures (160). L'adhésion à la surface de la feuille et la mobilité des bactéries grâce à leur(s) pili et flagelle(s) sont entre autres des facteurs déterminants. Les pili de type IV de *X. hyacinthi* permettent ainsi une adhésion des cellules bactériennes au niveau des stomates (184). La présence d'eau liquide est nécessaire aux bactéries, dont la mobilité peut être orientée par chimiotactisme (160). A partir de la comparaison des séquences de *X. axonopodis* pv. *citri* et *X. campestris* pv. *campestris*, Da Silva *et al.* (40) émettent une hypothèse sur le rôle majeur du chimiotactisme chez ces organismes.

4.2. Interactions entre la plante et la bactérie pathogène

Lorsqu'une bactérie phytopathogène arrive sur une plante, deux types de relations existent :

- *la relation incompatible*, qui comprend la mise en marche des défenses de la plante, se traduisant par une réaction hypersensible (RH). Cette RH intervient soit dans le cas où la bactérie infecte une plante non hôte, soit quand elle cherche à infecter une plante hôte résistante.
- *La relation compatible*, lorsque la bactérie pathogène infecte une plante hôte sensible, en étant capable d'échapper aux mécanismes de défenses de la plante et de provoquer les symptômes de la maladie.

La communication entre les deux organismes mis en jeu, la plante et la bactérie, est au centre de ces interactions. Cette communication est rendue possible par les déterminants du pouvoir pathogène dont les plus importants sont les gènes *hrp* et les gènes d'avirulence chez *Xanthomonas*.

4.3. Les déterminants du pouvoir pathogène

a. Déterminants jouant un rôle dans la virulence

Le groupe de gènes *hrp* (« hypersensitive responsible protein ») a été découvert grâce à la mutagenèse, et leur mutation provoque une incapacité à induire la RH sur les plantes résistantes et la maladie chez les plantes sensibles. Ces gènes ont donc un rôle dans le déclenchement des mécanismes de résistance chez la plante résistante et du pouvoir pathogène chez les plantes sensibles (13). Ce groupe de gènes a été l'objet de nombreuses études chez *Xanthomonas*, notamment au sein du pathovar *vesicatoria* (18-21). Le locus *hrp* comprend trois types de gènes : des gènes impliqués dans la régulation, des gènes codant pour des protéines constituant l'appareil sécrétoire de type III (impliqué dans l'importation de protéines à travers la membrane sans modification) appelés *hrc* (« *hrp* gene conserved ») et parfois des gènes codant pour des protéines effectrices (harpines) jouant un rôle dans la virulence (9, 80, 81).

Autres déterminants du pouvoir pathogène, les gènes d'avirulence, présents ou absents en fonction des races bactériennes, jouent un rôle dans la relation gène pour gène (57) : il a été démontré qu'un gène de résistance retrouvé chez une plante hôte correspondait à un gène d'avirulence bactérien. Lorsque les deux gènes sont présents, il y a incompatibilité,

mais l'absence d'au moins un de ces deux gènes conduit à la compatibilité et donc à la maladie (60).

Les gènes d'avirulence ont un rôle soit dans l'agressivité (famille de gènes *avrBs2*) (92), (64) ou dans la reconnaissance et le déclenchement des défenses *via* les gènes de résistance, par l'introduction d'une protéine par le système Hrp dans la cellule végétale (famille de gènes *avrBs3*).

Ainsi, lors de la réaction hypersensible, le contact et la reconnaissance entre une bactérie possédant ses gènes *avr* et *hrp* avec une plante contenant le gène de résistance correspondant permet de déclencher un mécanisme actif de mort cellulaire programmée, qui va arrêter la prolifération bactérienne au sein de la plante (169). Cette mort cellulaire, similaire à l'apoptose, limitée à la zone d'infection, intervenant dans les heures qui suivent l'infection. Le phénomène de résistance partielle et ses mécanismes sont par contre encore peu étudiés.

b. Déterminants jouant un rôle dans l'agressivité

Un certain nombre de déterminants jouent un rôle dans les caractéristiques des symptômes ainsi que dans l'aspect quantitatif de la maladie. Par exemple chez les *Xanthomonas* les toxines produites sont responsables de chlorose et l'aptitude à sécréter une plus ou moins grande quantité de toxine va conditionner la plus ou moins grande agressivité des souches (156, 160). Ceci concerne également des facteurs qui ne sont pas des déterminants majeurs pour les *Xanthomonas* comme les enzymes hydrolytiques, les polysaccharides, les lipopolysaccharides, les phytohormones (185).

Plus original est le mode d'action identifié pour des gènes d'avirulence de la famille de *avrBs3* chez *X. a. pv. vesicatoria* qui provoque des symptômes d'hypertrophie cellulaire chez les poivrons sensibles. La protéine AvrBs3, sécrétée par le système Hrp, est probablement un activateur transcriptionnel à l'intérieur de la cellule végétale qui induit l'expression de gènes habituellement induits par l'auxine et tous plus ou moins impliqués dans l'élongation cellulaire (107).

La modulation du pouvoir pathogène dépend ainsi d'un grand nombre de déterminants agissant sur la virulence ou l'agressivité, voire les deux. Une différence de spectre d'hôte et/ou de symptomatologie peut être due à une variation d'un seul gène ou même à une variation de séquence au sein d'un seul gène, mais aussi à une variation de l'équilibre entre les actions de plusieurs gènes. La caractérisation génétique des pathovars et

la mise en relation des pathovars avec une histoire phylogénétique en sont d'autant plus difficiles.

5. Problématique

La synthèse bibliographique présentée dans ce document met en évidence une réelle complexité au sein du pathovar *mangiferaeindicae* (*sensu* Dye). Ce pathovar regroupe en effet plusieurs *Xanthomonas* isolés de différents genres hôtes de la famille des Anacardiaceae. Les travaux d'analyse de ces souches ont montré des différences phénotypiques et génotypiques. Les tests de pouvoir pathogène (sur manguier et faux poivrier) effectués par Gagnevin *et al.* (60) suggèrent une spécificité d'hôte pour les souches isolées de ces deux Anacardiaceae, pourtant génétiquement proches. A l'heure actuelle, toutes ces souches restent regroupées au sein d'un seul pathovar.

Le chapitre II expose les travaux effectués afin d'étudier les souches du pathovar *mangiferaeindicae*. Pour cette étude, une approche polyphasique du pathovar a été adoptée, comme recommandé par Young *et al.* (198), par l'utilisation de marqueurs moléculaires (AFLP) en complément de tests de pouvoir pathogène, afin de délimiter la gamme d'hôtes précise des souches isolées d'Anacardiaceae. Cet outil de génotypage a également été utilisé pour étudier la variabilité génomique existante au sein d'une collection mondiale de souches isolées de manguier (sauf Brésil) et de faux poivrier, données exposées dans la seconde partie du chapitre II. L'ensemble des travaux exposés dans le chapitre II a fait l'objet d'une publication.

Dans la synthèse bibliographique, il a été souligné que les souches regroupées au sein du pathovar *mangiferaeindicae* n'avaient jamais été incluses dans les nombreuses études de taxonomie effectuées ces dernières années sur le genre *Xanthomonas*. A l'heure actuelle, la position taxonomique de ces bactéries phytopathogènes n'est toujours pas établie. Dans un contexte où la définition de l'espèce repose essentiellement sur des données d'hybridations ADN/ADN, technique lourde et difficile à mettre en œuvre, une approche polyphasique de la taxonomie des *Xanthomonas* a été adoptée, pour suivre les recommandations des comités de taxonomie (192), (173). Cette étude, qui compare des données de génotypage, des données de séquences de gènes de ménage et d'ARNr 16S, à des valeurs d'hybridation ADN/ADN est décrite dans le chapitre III, qui a fait l'objet d'un second article.

Chapitre II

Trois pathovars de
Xanthomonas infectent les
Anacardiacées

CHAPITRE II

TROIS PATHOVARS DE *XANTHOMONAS* INFECTENT LES ANACARDIACEES

Le chapitre II a fait l'objet de deux publications :

Pathological variation within *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* supports its separation into three distinct pathovars that can be distinguished by AFLP

N. Ah-You, L. Gagnevin, F. Chiroleu, E. Jouen, J. Rodrigues Neto, and O. Pruvost, 2007, *Phytopathology*, 97, 000:000 (publication acceptée en juin 2007)

First report in Myanmar of *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica* L.

N. Ah-You, L. Gagnevin and O. Pruvost, Myint, N.T., G. I. Johnson (soumis en juin 2007).

Les principaux points de ces articles sont discutés ci-dessous.

1. Problématique

En plus du manguier, hôte principal de *Xanthomonas* sp. pv. *mangiferaeindicae*, plusieurs membres de la famille des Anacardiacees ont été décrits comme hôtes, certains d'entre eux comme l'anacardier ou noix de cajou, ayant également une importance économique (43, 123, 134, 135, 150, 151, 155). Par ailleurs, les données phénotypiques et génétiques ont montré qu'il existait une grande variabilité entre les souches de *Xanthomonas* associées aux Anacardiacees en relation avec le spectre d'hôte mais également avec l'origine géographique (61, 62, 137, 140). Pour autant, toutes ces souches sont encore classées à l'heure actuelle au sein du pathovar *mangiferaeindicae*, conformément aux règles de classification en pathovar (48).

Devant la complexité du pv. *mangiferaeindicae*, nos objectifs étaient les suivants :

- Etudier de manière plus approfondie les relations génétiques intrapathovar entre les souches isolées d'hôtes différents.

- Clarifier le spectre d'hôtes précis et les différences en terme de symptomatologie de ces isolats par des tests de pouvoir pathogène.
- Utiliser les données de pouvoir pathogène et les données génétiques afin d'établir une classification polyphasique des souches en pathovar, comme recommandé par Young *et al.* (198).
- Evaluer la structuration des populations des *X. sp. pv. mangiferaeindicae* en fonction de leur zone géographique d'origine en utilisant des outils moléculaires tels que l'AFLP.

2. Méthodologie

Une collection de souches isolées de manguier (issues de zones géographiques diverses), de faux poivrier, d'anacardier et de prunier de Cythère a été utilisée pour ces travaux, par ailleurs des souches de quelques pathovars de *Xanthomonas* ont servi de référence. Voir liste en annexe p.129 (Tableau 5).

Les analyses AFLP impliquant quatre jeux d'amorces différents ont permis d'amplifier un grand nombre de marqueurs. Ces analyses ont été répétées deux fois, avec deux jeux d'ADN différents. Pour une approche génétique de la classification en pathovar, les données AFLP ont été utilisées, en comparant la souche pathotype du pathovar *mangiferaeindicae* aux souches isolées de faux poivrier, anacardier et prunier de Cythère. Cette technique a été également appliquée sur une collection mondiale (sauf Brésil) de souches isolées de manguier et de souches isolées de faux poivrier (à la Réunion) pour étudier leur diversité génétique. Les données AFLP ont permis de calculer des valeurs d'EGD ou « evolutionary genome divergence » (116, 130).

Des tests de pouvoir pathogène ont été effectués sur deux cultivars différents de manguier, sur faux poivrier, sur anacardier et sur prunier de Cythère, répétés deux fois. Des mesures de populations bactériennes dans les lésions et des surfaces sous la courbe de maladie (SSCM) ont été calculées pour quantifier l'agressivité des souches sur leur hôte d'origine et sur les autres hôtes potentiels de la famille des Anacardiacees.

3. Résultats et discussion

3.1. Relations génétiques intrapathovar

Les valeurs d'EGD calculées à partir des données AFLP montrent une grande hétérogénéité du pathovar *mangiferaeindicae* dont les souches sont distribuées en trois

groupes distincts. De plus, ces résultats suggèrent que l'affectation des souches appartenant au pathovar *mangiferaeindicae* au sein de l'espèce *campestris* est incorrecte mais que ce pathovar appartient à l'espèce *axonopodis*.

- **Groupe I** composé de souches isolées de manguier (zones géographiques différentes sauf Brésil) et de faux poivrier (Réunion), est génétiquement proche des souches de *X. axonopodis* sous-groupe 9.5 sensu Rademaker ($0.041 < \text{EGD} < 0.058$).
- **Groupe II** composé de souches isolées d'anacardier et de manguier au Brésil, est génétiquement proche des souches de *X. axonopodis* sous-groupe 9.6 ($0.032 < \text{EGD} < 0.059$).
- **Groupe III** composé de souches isolées de prunier de Cythère, génétiquement proche des souches de *X. axonopodis* 9.4 ($0.048 < \text{EGD} < 0.079$).

3.2. Pouvoir pathogène et clarification de la classification en pathovar

Deux types de réactions ont été observés après inoculation des souches des groupes I, II et III sur différentes anacardiées :

- Dans le cas d'inoculations sur l'hôte homologue (c'est-à-dire l'hôte d'origine de la souche inoculée) on a une réaction de type compatible : les valeurs de SSCM sont faibles (apparition des symptômes tardive) et les populations bactériennes 35 jours après inoculation sont fortes.
- Dans le cas d'inoculations sur l'hôte hétérologue (c'est-à-dire une plante qui n'est pas l'hôte d'origine de la souche inoculée) on a une réaction de type incompatible les SSCM sont élevées (apparition d'une réaction précoce) alors que les populations bactériennes dans les tissus sont faibles.

Ainsi, la spécialisation d'hôte qui avait été mise en évidence pour les souches de manguier et de faux poivrier (groupe I) est confirmée et le même type de relation existe pour les souches du groupe III (isolées de prunier de Cythère). Les souches du groupe II (isolées d'anacardier et de manguier au Brésil) ne causent une réaction de type compatible (faibles SSCM et forte multiplication bactérienne dans les tissus) que sur anacardier, tandis que sur manguier elles causent une réaction de type incompatible. Ces résultats laissent supposer que les souches de ce groupe qui ont été isolées sur manguier au Brésil sont des souches pathogènes d'anacardier opportunistes sur manguier. D'ailleurs elles ne causent pas d'épidémies significatives sur manguier dans ce pays.

Les résultats de pouvoir pathogène et les données génétiques nous permettent de proposer la division du pathovar *mangiferaeindicae* en trois pathovars distincts. Pour les

souches du groupe I pathogènes au sens strict sur manguier et sur faux poivrier et génétiquement proches des souches *X. axonopodis* sous-groupe 9.5, le nom de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* est proposé. Pour les souches du groupe II pathogènes sur anacardier (et probablement opportunistes sur manguier) et génétiquement proches du sous-groupe 9.6, nous proposons le nom de *X. axonopodis* pv. *anacardii*. Enfin, nous proposons le nom de *X. axonopodis* pv. *spondiae* pour les souches du groupe III, pathogènes exclusivement sur prunier de Cythère et génétiquement proches du sous-groupe 9.4.

3.3. Diversité génétique des souches de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*

A partir des données AFLP sur une collection de 328 souches de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*, nous avons calculé des dissimilarités de Jaccard, à partir desquelles deux représentations, un arbre phylogénétique (weighted neighbor-joining), et une représentation en « Multidimensional Scaling » ou MDS ont été construites. La représentation en MDS montre une répartition en 3 groupes de ces souches. Ces groupes sont cohérents avec ceux décrits précédemment par RFLP (61) en utilisant les sondes IS1595 (une séquence insertionnelle) et *avr* (gène d'avirulence de la famille de *avrBs3*). D'une manière générale, la technique AFLP, en accord avec les études précédemment effectuées sur ce pathogène, montre que la plus grande diversité génétique est observée en Inde et en Asie du Sud-Est. Cette région est celle de l'origine du manguier et ces résultats suggèrent une cohabitation de l'hôte et de son pathogène sur une plus longue durée, à l'origine de cette diversité. De plus, la grande similarité génétique observée au sein des autres groupes contenant des souches d'origines géographiques diverses suggère une migration de la bactérie, probablement via des échanges internationaux de matériel végétal de manière non contrôlée.

L'objectif principal de cette étude était d'apporter des informations complémentaires aux études précédemment effectuées sur les souches du pathovar *mangiferaeindicae*, afin de pouvoir clarifier la complexité de ce pathovar rassemblant des souches isolées d'hôtes différents, mais appartenant à la même famille botanique. Lors de ce travail, l'utilisation de la technique AFLP a permis de montrer des différences génétiques entre ces souches, en générant des marqueurs neutres, de manière aléatoire sur l'ensemble du génome bactérien. De plus, nos résultats démontrent que les données issues des tests de pouvoir pathogène

sont corrélées aux données génétiques, et ont permis de scinder le pathovar *mangiferaeindicae* en trois pathovars distincts.

Jusqu'à présent, l'affectation de souches au sein d'un pathovar donné ne reposait que sur des tests de pouvoir pathogène qui ne différencient les isolats que sur leur virulence (la gamme d'hôte) et leur agressivité (principalement la symptomatologie). Malgré de nombreux travaux visant à l'identification de déterminants du pouvoir pathogène, les choses sont assez peu claires quant aux fondements génétiques du pathovar ou à la signification phylogénétique du pathovar. Par ailleurs Young *et al.* (198) recommandent clairement d'aborder la classification en pathovar par une approche polyphasique, à l'instar de ce qui se fait pour la classification taxonomique des bactéries. D'autres bactéries du genre *Xanthomonas* ont été l'objet d'études similaires : *X. axonopodis* pv. *manihotis* (146, 147), *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (46).

A terme, pour notre pathosystème, l'identification de souches par AFLP et leur affectation au sein de l'un des trois pathovars décrit dans notre étude est possible avant même d'effectuer des tests de pouvoir pathogène, qui sont beaucoup plus longs à mettre en place. Toutefois, l'évaluation du pouvoir pathogène reste la seule possibilité pour distinguer une souche isolée de manguier d'une souche isolée de faux poivrier.

D'autre part, les données AFLP montrent une grande similarité au sein des *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*. En effet, comme l'on montré les études menées précédemment, les souches isolées de manguier restent indiscernables génétiquement des souches isolées de faux poivrier, lorsqu'un outil moléculaire produisant des marqueurs neutres tels que IS-RFLP ou l'AFLP est utilisé. De même, nos travaux montrent que des isolats de manguier originaires de pays éloignés géographiquement ne sont pas différenciables par AFLP, mise à part les souches isolées en Asie du Sud-Est et en Inde. Cette grande diversité des souches isolées de cette région peut être interprétée par le fait qu'il s'agit de la région d'origine du manguier : d'une part c'est probablement la région où les populations de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* sont les plus anciennes et donc ont eu le plus de temps pour se diversifier, d'autre part c'est également la région où existe la plus grande diversité de l'hôte, ce qui a probablement résulté en une grande variation des pressions de sélection sur l'agent pathogène et donc un maintien de sa diversité. Récemment, des souches ont été isolées de manguier en Birmanie. Un premier travail d'inoculation sur plante a permis de montrer que ces souches font partie du pv. *mangiferaeindicae* sensu stricto, ce qui est confirmé par l'analyse AFLP qui permet même de montrer que ces souches sont phylogénétiquement proches de celles des autres régions du Sud-Est asiatique (8).

L'AFLP a également permis de confirmer la distinction en groupes A, B et C obtenue par RFLP. Si ces groupes ne correspondent pas à une différenciation phylogéographique des souches, ils sont probablement à mettre en relation avec le mode de dissémination historique de la maladie. Il est probable que le fait que des souches d'un même groupe se retrouvent dans des régions très éloignées (Afrique du Sud et Nouvelle Calédonie par exemple) reflète des introductions de manguiers (et de bactéries) de même origine. Comme pour d'autres études sur la diversité de pathovars de *Xanthomonas* (23, 157) l'AFLP s'est avéré être un outil très intéressant pour étudier la structure de populations principalement en relation avec les caractéristiques épidémiologiques des maladies correspondantes (époque d'introduction, efficacité de dissémination à courte distance, mode de dissémination à longue distance, etc).

Si les données AFLP ont permis de distinguer des souches qui se différencient également pour leur pouvoir pathogène (et d'appuyer la création de nouveaux pathovars) pour la plupart des souches, cette technique n'a pas permis la distinction des souches isolées de manguiers des souches isolées de faux poivrier à la Réunion. Là encore ces résultats confirment les données RFLP obtenues avec des marqueurs neutres (IS1595) (60, 61). Ces deux types de souches ont montré une grande similarité du point de vue phénotypique et génétique (étude de caractères phénotypiques et biochimiques (137, 140), MLEE (171), IS RFLP, AFLP lors de notre étude) alors qu'une spécialisation d'hôte est observée lors de tests de pouvoir pathogène. Cette spécialisation d'hôte n'est cependant pas aussi tranchée que pour les souches d'autres pathovars attaquant les anacardiées : dans un sens ou dans l'autre les souches les plus agressives sur l'hôte hétérologue (hôte différent de celui d'origine) sont plus agressives que les souches les moins agressives sur leur hôte homologue (hôte d'isolement d'origine). Le fond génétique apparemment uniforme et une spécialisation du pouvoir pathogène relativement imparfaite laissent supposer une différenciation récente des deux populations et dont les mécanismes concerneraient un très petit nombre de gènes, par exemple des gènes d'avirulence de la famille de *avrBs3* dont il a été montré qu'ils sont les seuls marqueurs qui permettent de différencier les deux populations (60, 61).

L'un des projets de cette thèse était d'appliquer un schéma de multilocus sequence typing (MLST) afin d'apporter de nouveaux outils d'étude de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* au niveau populationnel.

La technique MLST (104) permet les études épidémiologiques au sein d'espèces en étudiant des séquences de 500 à 700 pb de gènes de ménage (en général sept gènes). Chaque séquence unique est ensuite désignée comme un allèle distinct et la combinaison des allèles de ces sept gènes détermine le « sequence type » ou « séquençotype » (ST) d'une souche

donnée. La comparaison de ces allèles et la détermination des ST se fait essentiellement à partir de bases de données cumulatives. Le MLST est donc une technique reproductible, transposable, et automatisable, permettant la détermination de modèles évolutifs au sein de la population bactérienne étudiée : clones, relations phylogénétiques, microévolution. Cinq gènes de ménages ont été sélectionnés : *pyrG*, *recG*, *gyrB*, *leuS* et *mutS*, et des séquences de 50 souches de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* ainsi que d'autres pathovars sous groupes *axonopodis* 9.4, 9.5 et 9.6 ont été étudiées. Lors de l'analyse des séquences de ces cinq gènes pour les souches de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* au sens strict, aucun allèle différent n'a pu être décrit. Toutes les souches se sont avérées être identiques, quel que soit le gène considéré. La seule diversité observée concernait la comparaison de souches d'autre pathovars de *X. axonopodis* : *X. axonopodis* pv. *axonopodis* (souche type de l'espèce, 9.3), *X. axonopodis* pv. *spondiae* (9.4), *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (9.4), *X. axonopodis* pv. *citri* (9.5), *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (9.5), *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (9.6), *X. axonopodis* pv. *anacardii* (9.6). L'étude de ces cinq gènes a permis de retrouver les groupes décrits par Rademaker, suggérant ainsi une grande utilité de cette méthode pour comprendre l'histoire évolutive de cette espèce du genre *Xanthomonas*. Toutefois, le MLST n'est pas d'un pouvoir discriminant suffisant pour différencier nos souches de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*. D'autres études ont démontré que cette technique n'est pas toujours utilisable, notamment pour les bactéries dont l'histoire évolutive est trop récente pour pouvoir déceler de la diversité génétique en étudiant un jeu de plusieurs gènes de ménage (4, 93). Chez les *Xanthomonas* la technique a été utilisée avec succès récemment pour des populations de *X. campestris* (55) confirmant que son utilité dépend du niveau de variabilité à l'intérieur du groupe étudié.

Pour les populations de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* ou d'autres bactéries à faible diversité, il serait intéressant d'envisager l'utilisation de marqueurs dont l'horloge moléculaire évolue plus vite pour pouvoir caractériser ces populations de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*, comme par exemple l'étude de minisatellites. Les minisatellites (Variable number of tandem repeats ou VNTR) sont généralement analysés en multilocus (Multilocus variant-repeat analysis ou MLVA). Chez de nombreuses bactéries (*Salmonella typhi*, *Yersinia pestis*...) réputées pour être très monomorphes en MLST (3, 93, 95), l'utilisation d'un système MLVA a permis une meilleure différenciation de ces souches, dans le cadre d'études épidémiologiques à long terme ou en phylogénie (103).

4. Conclusion

L'utilisation d'une approche polyphasique pour étudier la complexité du pathovar *mangiferaeindicae* nous ont permis de montrer une corrélation entre données génétiques et données de pouvoir pathogène pour notre pathosystème. De ce fait, il est possible d'utiliser l'AFLP pour identifier les souches causant des maladies sur les Anacardiacees et permettre leur classification en pathovars en complément des tests de pouvoir pathogène, ce qui est en accord avec les recommandations de Young *et al.* (198).

Cette étude nous permet de proposer la classification en pathovars suivante :

- *Xanthomonas axonopodis* pathovar *mangiferaeindicae*, pour les souches pathogènes sur manguier au sens strict (sauf Brésil) et pathogènes sur faux poivrier
- *Xanthomonas axonopodis* pathovar *anacardii*, pour les souches pathogènes sur anacardier et sur manguier au Brésil
- *Xanthomonas axonopodis* pathovar *spondiae*, pour les souches pathogènes sur prunier de Cythère.

PATHOLOGICAL VARIATIONS WITHIN *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV.
MANGIFERAEINDICAE SUPPORT ITS SEPARATION INTO THREE DISTINCT
PATHOVARS THAT CAN BE DISTINGUISHED BY AFLP

N. Ah-You, L. Gagnevin, F. Chiroleu, E. Jouen, J. Rodrigues Neto, and O. Pruvost

First, second, third, fourth and sixth authors: Research plant pathologists and statistician (third author), CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7, chemin de l'Irat, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France ; and fifth author: Research plant pathologist, Lab. Bacteriologia Vegetal, Instituto Biologico, Campinas, SP, Brazil.

Corresponding author: O. Pruvost. - Email: olivier.pruvost@cirad.fr

ABSTRACT

Bacterial black spot, caused by *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, is an important disease of mango (*Mangifera indica* L.). Several other plant genera of the *Anacardiaceae* were described as host species for xanthomonads. We studied pathological variations among strains in a worldwide collection from several *Anacardiaceae* genera. Strains were classified into three pathogenicity groups. Group I strains (from the Old World) multiplied markedly in leaf tissue of mango and cashew (*Anacardium occidentale* L.). Group II strains (from Brazil) multiplied markedly in cashew leaf tissue, but not in mango. Moreover, mango leaves inoculated with group I and group II strains exhibited lesions with different morphologies, consistent with variations in symptomology previously reported on mango under field conditions. Group I strains produced black, raised lesions, consistent with the original description of the pathovar, whereas group II strains produced brownish, flat lesions. Group III strains produced a unique syndrome on ambarella (*Spondias dulcis* Forst.) and mombin (*S. mombin* L.). Based on evolutionary genome divergence derived from AFLP data, the three groups were genetically distinct and were related to groups 9.5, 9.6, and 9.4 of *X. axonopodis* identified by Rademaker, respectively. As each group was characterized by unique symptomology and/or host range, we propose that *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* be split into three pathovars of *X. axonopodis*: *X. axonopodis* pv.

mangiferaeindicae, *X. axonopodis* pv. *anacardii* and *X. axonopodis* pv. *spondiae*. Within pv. *mangiferaeindicae sensu novo*, AFLP data was consistent with that previously published for RFLP groups and suggested long distance movement of the pathogen, likely through propagative material.

Additional keywords: AUDPC, Brazilian pepper, *in planta* population sizes, leaf lesion morphology.

INTRODUCTION

Mango (*Mangifera indica* L.) is one of the most cultivated fruits in the world (5th in worldwide production in 2004 - <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>). Mango belongs to the *Anacardiaceae* family, which is mostly represented in tropical and subtropical areas. Mango Bacterial Black Spot (MBBS) (also called Mango Bacterial Canker) is an important bacterial disease that affects mango in many countries. This disease was first described in 1915 by Doidge (45) in South Africa but may have originated from India, as the disease was observed in herbarium specimens collected in Bihar in 1881 (125). Because no efficient control can be achieved, MBBS causes recurrent problems in the major mango producing regions : Asia, southern and eastern Africa, western Oceania, and the Indian Ocean (62). MBBS has been reported in Brazil since 1953 (150) and is a major menace for industries in Central America, which have become increasingly important mango exporters (e.g. Mexico ranked first in 2004 and represented 23 % of the world exports - <http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>). Under climatic conditions favoring MBBS, the disease commonly causes fruit losses of up to 85 % (132).

On mango, the pathogen infects plants through wounds and natural openings. Leaf and fruit lesions are most commonly observed. Symptoms on leaves are raised, black, angular and necrotic, and those on fruits are star-shaped, erumpent with a gummy exudate. Lesions on twigs or branches occasionally occur, most often after hurricanes, but no twig dieback was reported (62). The pathogen is disseminated on a smaller scale mostly through climatic events such as wind-driven rains or through cultural practices. Long distance dissemination is due to international movement of contaminated plant material (62). One report from Brazil (163) indicates a unique symptomology on mango leaves, twigs and fruits in this country. Leaf lesions in Brazil were reported as brownish, flat angular spots. Fruit lesions were described only on a few cultivars as black, depressed and rounded lesions of irregular sizes. Some lesions only display depressions, with no other external changes, but show an internal pulp decay consisting of tissue discoloration sometimes associated with a pulp rot.

The pathogen in Brazil also induces unique twig symptoms, i.e. yellow to brown lesions, which subsequently longitudinally crack and evolve as a generalized dieback of the youngest vegetative flush.

The causal agent of MBBS is a Gram-negative bacterium, classified in the *Xanthomonas* genus in the 1970's (48) as *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*. In contrast with most xanthomonads, it produces non-pigmented colonies on agar media (62). However, yellow-pigmented cultures were sporadically isolated in Brazil, South Africa, Florida and Reunion Island (61). These strains are casual pathogens and should not be classified as pathovar *mangiferaeindicae* (62).

Reclassification of the genus *Xanthomonas* by a polyphasic approach including DNA:DNA hybridization did not include the pathovar *mangiferaeindicae* (187).

The pathovar classification established by Dye *et al.* (48) and reviewed by Young *et al.* (198) is an infrasubspecific classification applied to bacterial plant pathogens by reference to their host range or to their capacity to cause distinctive symptoms. Pathogenicity tests are an essential part of this classification. The pathovar classification was primarily developed for plant protection regulators and quarantine officers (198) and has no standing in formal nomenclature regulated by the International Code of Nomenclature of Prokaryotes because it is applied at the infrasubspecific level.

Mango is the host species from which the disease was originally described (45), giving its name to the pathovar (48). But early work also indicated that, when inoculated, mango strains from India were pathogenic to other members of the *Anacardiaceae*, such as cashew (*Anacardium occidentale* L.) and hog plum (also called ambra or Indian mombin - *Spondias mangifera* Willd., syn. *S. pinnata* (J. G. König ex L. f.) Kurz.) (125). More recently, xanthomonads producing non-pigmented colonies were described as the causal agent of a bacterial dieback of ambarella (*Spondias dulcis* Forst., syn. *Spondias cytherea* Sonn.) in the French West Indies (155) and a black spot of Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in Réunion Island (135). In Brazil, a disease caused by xanthomonads was described on cashew and mango (123, 150), whereas in the Old World no disease on cashew was reported, even in countries where MBC is present (62). In Brazil, non-pigmented xanthomonads were isolated from mango in several states in the north, northeast and southeast regions (150), where its importance is globally low but depends on climatic conditions and cultivars (15). No report is available of Brazilian pepper infected by a xanthomonad in Brazil.

Phenotypic (137), isozyme (171), and RFLP analysis (using a *hrp* gene cluster as probe) (61) suggested that strains isolated in the Old World on mango and Brazilian pepper are closely

related. These strains were distantly related to mango strains isolated in Brazil, strains from ambarella, and yellow-pigmented strains from mango. Two RFLP probes, an avirulence (*avr*) gene (*avrXa10*) cloned from *X. oryzae* pv. *oryzae* and belonging to the *avrBs3* gene family (83) and an insertion sequence (IS1595) from *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* were used to further study the genetic variability among *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* strains collected from different geographic regions. The *avr* probe primarily distinguished strains on the basis of the host from which they originated (mango or Brazilian pepper), whereas the IS probe distinguished strains based on the country from which they originated (61).

Because pv. *mangiferaeindicae* is of considerable economic significance worldwide, we examined the genetic diversity (using AFLP) and the pathological variation of a worldwide collection of strains from selected genera in the *Anacardiaceae*. In the present study, we show that pv. *mangiferaeindicae* is a genetically and pathologically complex pathovar. As recommended by Young *et al.* (198), we assessed associations between pathogenicity characters and AFLP data, a technique suitable for pathovar identification purposes (142). Some strains had a unique host range and/or differed in terms of symptom morphology and ability to multiply in host tissue. Therefore, we propose to reclassify *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* into three pathovars.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and DNA extraction. The geographic origins and other characteristics of the 326 strains of *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* used in this study are described in Supplementary Table 1. Reference strains used, including pathotype strains of relevant pathovars, are listed in Supplementary Table 1.

Strains were stored at -80°C on beads in cryovials (Microbank™ Prolab Diagnostics, Austin, TX, USA) and also freeze-dried for a long term storage. Cultures were grown routinely on YPGA (7g yeast extract, 7g peptone, 7g glucose and 15g agar L⁻¹; 20mg propiconazole L⁻¹) at 28°C. Some strains included in this study were deposited in the Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP, INRA Angers, France), the BCCM/LMG (Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms, University of Ghent, Belgium) and the National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBB, CSL, York, United Kingdom).

Genomic DNA was extracted from bacteria using the DNeasy® tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions and DNA concentrations were estimated by fluorometry (TKO 100 Fluorometer, Hoefer, San Francisco).

AFLP analysis. All strains of *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* were subjected to AFLP analysis. To test the reproducibility of the AFLP technique, two independent DNA extractions were used and strain CFBP 2933 was used as a control in each AFLP experiment. PCR reactions were performed in a GeneAmp PCR system 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Adaptors and PCR primers were synthesized by Applied Biosystems (Table 1).

AFLP analysis was performed as described previously (85). The selective amplifications were performed using unlabeled *Msp*I + 1 (A, C, T or G) primers and 5'-labeled - *Sac*I + C primers (fluorochromes used: 6-FAM, VIC, NED, PET respectively).

The presence and absence of fragments were scored as a binary matrix. A dissimilarity matrix using Jaccard index was calculated and a weighted neighbor-joining tree (162) was built using DARWIN 5.0 software (127). The robustness of the tree was assessed by bootstrap analysis with the same software (1000 samplings).

Metric multidimensional scaling (MDS) was used to represent distances between strains, based on the Jaccard dissimilarity matrix. MDS transforms a distance matrix (which cannot be analyzed by eigen-decomposition) into a cross-product matrix and then solves the eigenvector problem to find the coordinates of individuals, so that distortions to the distance matrix are minimized. As in Principal Component Analysis, individuals are projected into n dimensions (2). This technique is becoming popular for analyzing ecological data (22, 24). MDS was performed using the *cmdscale* function in the R software (version 2.3.1; R Development Core Team, Vienna, Austria).

AFLP patterns of strains of *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* were compared to those of the type strain of *X. campestris* and *X. axonopodis* (obtained from LMG as LMG 568 and LMG 982, respectively). AFLP patterns of other pathovars of *X. axonopodis* belonging to groups 9.1 to 9.6 *sensu* Rademaker (143) were also compared to strains isolated from *Anacardiaceae*. For such comparisons, evolutionary genome divergences (EGD), expressed as the number of nucleotide substitutions per site, were calculated from Dice similarity index and corrected to account for unobserved substitutions by using the standard Jukes-Cantor model, which assumes equal substitution rates between all pairs of bases (116).

Ligation adaptators	sequence 5' > 3'
A1MSP	GACGATGAGTCCTGAG
A2MSP	CGCTCAGGACTCATC
A1SAC	CTCGTAGACTGCGTACAAGCT
A2SAC	TGTACGCAGTCTACG
Preamplification primers	sequence 5' > 3'
PMSP	GATGAGTCCTGAGCGG
PSAC	TAGACTGCGTACAAGCTC
Selective amplification primers	sequence 5' > 3'
<i>MspI</i> + 1 selective nucleotide	GATGAGTCCTGAGCGG + A, C, T, or G
5'-labeled <i>SacI</i> + C	6-FAM - TAGACTGCGTACAAGCTCC
	VIC - TAGACTGCGTACAAGCTCC
	NED - TAGACTGCGTACAAGCTCC
	PET - TAGACTGCGTACAAGCTCC

TABLE 1 AFLP Primers and adaptators used in this study

Pathogenicity tests on mango, cashew, and Brazilian pepper. Strains used for pathogenicity tests are indicated in Table 2 (comparison of strains identified as *X. axonopodis* groups 9.4, 9.5 and 9.6) and Table 3 (comparison of a larger set of strains identified as *X. axonopodis* group 9.5 from two different host species). Brazilian pepper, mango cvs. Maison Rouge and Haden and/or cashew were used for inoculations. Bacterial suspensions containing approximately 10^5 cfu ml⁻¹ were obtained by tenfold dilutions of spectrophotometrically adjusted suspensions (0.06 OD at 600 nm $\approx 10^8$ cfu ml⁻¹) prepared from 18 hour-old cultures on YPGA. Suspensions were infiltrated (0.3 - 0.4 cm²) into the mesophyll of mature leaves from the youngest vegetative flush. For each strain, 10 inoculation points were performed on each of three leaves on different plants. Each experiment was replicated once. Plants were placed in growth chambers at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ day and $26 \pm 1^\circ\text{C}$ night and $95 \pm 5\%$ relative humidity for 35 days with a photoperiod of 12 hours. All inoculated leaves were examined daily for 20 days (comparisons of AFLP group

9.5 and 9.6) or 25 days (comparisons of strains within AFLP group 9.5) for lesion development (i.e. the number of visible lesions per leaf).

X. campestris pv. *mangiferaeindicae* population sizes in lesions from the same host species were estimated 35 days after inoculation (dai) for strains listed in Tables 2 and 3. For each strain/host combination, eight leaf fragments ($\approx 1 \text{ cm}^2$) collected at inoculation sites were sampled. Leaf fragments were excised from the leaf blade, surface-sterilized with 95 % ethanol and individually homogenized in 4.5 ml of 0.01 M pH 7.2 Sigma™ 7-9 buffer (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) using an Ultraturax T25 homogenizer (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Germany). Aliquots of the homogenized suspensions and of tenfold dilutions obtained from the suspensions were plated on semi-selective media (141) using the Spiral System device (Interscience, Saint Nom la Bretèche, France). We used three media (KC and NCTM3 semi-selective media (141) and modified Wilbrink's medium (154)), depending on the strains we compared. Bacterial population sizes were based on enumeration of *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*-like colonies (starch hydrolysis was checked on doubtful colonies).

Pathogenicity tests on ambarella and mombin. Strains CFBP 2547, CFBP 2623 (isolated from ambarella in the French West Indies), as well as *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* CFBP 1716 (pathotype strain isolated from mango in India) and CFBP 2913 (isolated from mango in Brazil) were used for inoculation. Bacterial suspensions containing approximately 10^8 cfu ml^{-1} ($0.06 \text{ OD at } 600 \text{ nm} \approx 10^8 \text{ cfu ml}^{-1}$) prepared from 24 hour-old cultures on YPGA were used. Inoculations were performed by wounding a herbaceous part of the main stem with a sterile scalpel and depositing a $10 \mu\text{l}$ droplet on the wound. For each strain, three seedlings (3-5 months old) of both species were inoculated. Each experiment was replicated once. Plants were placed in growth chambers at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ and $95 \pm 5 \%$ relative humidity for 30 days with a photoperiod of 12 hours. All inoculated plants were examined weekly for lesion development. At the end of each experiment, reisolation of the pathogen from twig symptoms was performed on YPGA or modified Wilbrink medium (154).

Data analysis. AUDPC (area under disease progress curve) values were calculated for each inoculated leaf (29). Variance homogeneity was examined using the Bartlett test. This criterion was not met by some data sets. Therefore, non-parametric tests (Kruskal-Wallis and pairwise Mann-Whitney) were performed using R statistical package (version 2.3.1; R Development Core Team, Vienna, Austria).

Bacterial population sizes were log-transformed to stabilize sample variances. Variance homogeneity was examined using the Bartlett test. This criterion was not met for some data

sets, as data derived from strains with a lower *in planta* growth ability displayed higher sample variance values. Therefore, non-parametric tests (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney) were performed using the R statistical package (version 2.3.1; R Development Core Team, Vienna, Austria).

RESULTS

Genetic relatedness among pathovar *mangiferaeindicae* strains and outgroups.

Evolutionary genome divergence (EGD) values were calculated from AFLP data and indicated that xanthomonads associated with *Anacardiaceae* were highly heterogeneous and comprised three main groups of strains. The first group consisted of strains isolated from mango and Brazilian pepper and originating from all countries in the Old World (supplementary Table 1). The second group consisted of strains isolated from both mango and cashew and that originated in Brazil. The third group consisted of strains isolated from ambarella and that originated in the French West Indies. Examples of EGD values between selected strains from the three groups and other *Xanthomonas* strains are shown in Fig. 1.

EGD values between strains inside a group ranged between 0.001 and 0.014 nucleotide substitutions per site for group I, 0.003 and 0.022 nucleotide substitutions per site for group II, and there was no polymorphism between the two strains that constituted group III. Minimal EGD values between group I vs. group II and group III strains were 0.062 and 0.116 nucleotide substitutions per site, respectively. Similarly, the minimal EGD value between group II vs. group III strains was 0.103 nucleotide substitutions per site.

EGD values calculated between each group defined in the present study and reference strains of *X. axonopodis* and *X. campestris* (Fig. 1) indicated the closest *X. axonopodis* subgroups defined by Rademaker *et al.* (143). Group I strains were genetically related to the *X. axonopodis* group 9.5, with EGD values ranging between 0.041 and 0.058 nucleotide substitutions per site (with *X. axonopodis* pv. *citri* (CFBP 2525) and *X. axonopodis* pv. *vitians* (LMG 937), respectively). Group II strains were closely related to the *X. axonopodis* group 9.6, with EGD values ranging between 0.032 and 0.059 nucleotide substitutions per site (for *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (CFBP 2866) and *X. axonopodis* pv. *vignaeradiatae* (LMG 936), respectively). Group III strains were most closely related to strains belonging to the *X. axonopodis* group 9.4, with EGD values ranging between 0.048 and 0.072 nucleotide substitutions per site (with *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (LMG 695) and *X. axonopodis* pv. *manihotis* (CFBP 2603), respectively).

The EGD value between the pathotype strain of *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (CFBP 1716) and the type strains of *X. axonopodis* (LMG 982) and *X. campestris* (LMG 568) were 0.149 and 0.140 nucleotide substitutions per site, respectively (Fig. 1).

Genetic diversity within group I strains from AFLP data. One hundred and thirty seven markers obtained by pooling data derived from the four selective primers were used for analysis. Sizes of the selected bands ranged from 47 to 408 bp, and 37 bands among 137 (27 %) were polymorphic. The polymorphic markers allowed the identification of 125 haplotypes among the 328 group I strains (Supplementary Table 1). The overall genetic diversity within group I strains was low, with maximal Jaccard dissimilarity values around 0.15 (i.e. EGD values of 0.014 nucleotide substitutions per site). Most branches in the neighbor-joining tree were characterized by low (i.e. ≤ 70 %) bootstrap values. Seven subgroups were supported by moderately robust bootstrap values. The first subgroup (bootstrap 84 %) was composed of mango strains originating from the Comoros. Two subgroups (bootstrap 78 %) were composed of mango strains originating from five Asian countries (Japan, Philippines and Taiwan, Thailand and India) (Fig. 2A). Other subgroups with bootstrap values > 70 % were composed of mango strains isolated in Réunion Island. Based on the neighbor-joining tree (Fig. 2A) and the representation of axes 1 and 2 of the MDS (Fig. 2B), the population structure derived from AFLP analysis is partly congruent with that previously described by RFLP. Strains from mango or Brazilian pepper were not clearly separated.

Pathogenicity tests on mango, cashew and Brazilian pepper. All strains listed in Table 2 induced black lesions after inoculation on mango, cashew and Brazilian pepper, with two distinct morphologies. Mango leaves inoculated with strains originating from mango and identified as group I (which are genetically related to *X. axonopodis* group 9.5) showed raised, black, angular lesions. Brazilian pepper and cashew leaves inoculated with the same strains showed flat, necrotic, angular lesions. All other plant/strain combinations produced necrotic flat lesions. Cashew leaves showed extensive watersoaking (which developed to form black necrotic lesions) only when inoculated with group II strains (which are genetically related to *X. axonopodis* group 9.6). Similarly, Brazilian pepper leaves displayed an extensive watersoaking, which developed to form black necrotic lesions, only when inoculated with group I strains originating from this host species. AUDPC values summarizing lesion development of selected group I, II and III strains are presented in Table 2. Except for interactions involving group III strains, large AUDPC values primarily indicated an earlier development of lesions, as maximal incidence values were reached after

5 to 15 dai. Although significant differences among strains were observed, AUDPCs were not very helpful at clarifying distinctive pathogenicity between groups of strains.

Strain	Host of origin	Proposed pathovar designation ¹	AFLP group ²	Species inoculated		
				Mango	Cashew	Brazilian pepper
CFBP 1716 ³	Mango	<i>mangiferaeindicae</i> (I)	9.5	101.3 ⁴ (12.9) ⁵ c ⁶	155.3 (6.6) a	151.5 (12.4) bc
JK147-1	Mango	<i>mangiferaeindicae</i> (I)	9.5	95.8 (12.3) d	151.7 (2.1) a	150.5 (14.1) bc
A5-1	Mango	<i>mangiferaeindicae</i> (I)	9.5	95.0 (15.5) d	144.0 (3.2) b	148.5 (11.9) bc
CFBP 2939	Br. pepper	<i>mangiferaeindicae</i> (I)	9.5	119.0 (13.4) bc	150.3 (2.4) a	146.0 (9.4) c
CFBP 2912	Mango	<i>anacardii</i> (II)	9.6	123.8 (4.6) b	145.8 (4.2) b	167.7 (6.7) a
CFBP 2913	Mango	<i>anacardii</i> (II)	9.6	123.3 (3.9) b	152.3 (3.0) a	169.7 (6.4) a
CFBP 2914	Mango	<i>anacardii</i> (II)	9.6	124.0 (4.0) b	154.2 (5.2) a	160.8 (10.5) ab
JY542	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	136.8 (7.3) a	149.8 (0.4) a	160.3 (6.7) ab
LA98	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	138.7 (5.4) a	151.2 (2.5) a	163.7 (11.9) ab
LA99	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	136.2 (4.5) a	150.2 (4.9) a	169.5 (5.7) a
LA100	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	124.8 (2.2) b	152.2 (4.8) a	160.8 (7.9) ab
LA101	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	126.5 (3.9) b	150.3 (5.6) a	161.7 (11.0) ab
LA102	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	124.5 (2.4) b	152.8 (4.3) a	158.7 (12.8) ab
LA103	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	124.7 (5.0) b	150.3 (4.8) a	161.0 (6.7) ab
CFBP 2547	Ambarella	<i>spondiae</i> (III)	9.4	107.3 (13.9) cd	121.2 (4.9) c	97.0 (31.7) d

TABLE 2. Lesion development based on AUDPC after inoculation of three host species with xanthomonads originating from *Anacardiaceae* and identified as AFLP groups 9.4, 9.5 and 9.6 of *Xanthomonas axonopodis*

¹ Pathogenicity groups are given in parenthesis.

² This study. Group numbers as defined in (142, 143).

³ Pathotype strain.

⁴ AUDPC values were based on lesion development on ten inoculation sites per leaf. A total of six AUDPC values per strain-host combination was used for mean and standard deviation calculation.

⁵ Values in parentheses are standard deviations, based on two replicated experiments

Strain	Host of origin	Country of origin	RFLP group ¹	Species inoculated		
				Mango	Brazilian pepper	
CFBP 2935	Mango	Australia	C	165.3 ² (10.5) ³	b ⁴	181.8 (10.1) a
CFBP 1716 ⁵	Mango	India	C	151.3 (12.9)	bc	181.5 (12.4) a
JK147-1	Mango	Philippines	B	145.8 (12.3)	c	180.5 (14.1) ab
A5-1	Mango	Réunion	A	145.5 (18.6)	bc	165.8 (2.1) bc
CFBP 2932	Mango	Réunion	A	143.8 (21.2)	bc	167.5 (7.9) b
CFBP 2933	Mango	Réunion	C	143.2 (23.1)	bc	178.0 (20.7) ab
JV1121	Mango	South Africa	ND	164.0 (14.5)	b	181.5 (7.1) a
CFBP 2938	Brazilian pepper	Réunion	D	194.4 (5.9)	a	164.7 (4.7) bc
CFBP 2939	Brazilian pepper	Réunion	D	182.5 (7.6)	b	149.7 (15.6) d
CFBP 2940	Brazilian pepper	Réunion	D	173.5 (17.1)	b	155.5 (19.6) bcd
JP742	Brazilian pepper	Réunion	D	133.3 (18.2)	c	160.3 (9.2) cd
JP758	Brazilian pepper	Réunion	D	181.0 (10.5)	b	155.3 (12.7) cd

TABLE 3. Pathological variations based on AUDPC within pathogenicity group I strains (AFLP group 9.5) after inoculation of mango and Brazilian pepper

¹ From (61) – ND: not determined.

² AUDPC values were based on lesion development on ten inoculation sites per leaf. A total of six AUDPC values per strain-host combination was used for mean and standard deviation calculation

³ Values in parentheses are standard deviations, based on two replicated experiments.

⁴ Strain comparisons based on Mann-Whitney tests. AUDPC values with the same letter(s) did not differ significantly ($P = 0.05$).

⁵ Pathotype strain.

On mango cv. Maison Rouge, large population densities (ranging from 5×10^6 to 9×10^6 cfu per lesion) were observed only for group I strains originating from mango (Table 4). Populations sizes from all other strains were 1×10^5 cfu per lesion or lower (Table 4). Similar results were obtained from inoculations of mango cv. Haden. On this cultivar, mean population sizes estimated for group II strains from mango (CFBP 2912, 2913 and 2914) ranged from 5×10^4 to 2×10^5 cfu per lesion, whereas the population size calculated for the group I pathotype strain (CFBP 1716) was 1×10^7 cfu per lesion.

In contrast, lesions produced on cashew after inoculation with all group II strains developed large population sizes, ranging from 3×10^7 to 9×10^7 cfu per lesion (Table 4). Similarly, group I strains originating from mango multiplied to high population densities in cashew

(2×10^7 to 3×10^7 cfu per lesion - Table 4), but the group I strain CFBP 2939 originating from Brazilian pepper did not (7×10^4 cfu per lesion - Table 4).

Strain	Host of origin	Proposed pathovar designation ¹	AFLP group ₂	Species inoculated		
				Mango	Cashew	Brazilian pepper
CFBP 1716 ³	Mango	<i>mangiferaeindicae</i> (I)	9.5	$6.88^4 \pm 0.62^5$ a ⁶	7.51 ± 0.20 d	6.67 ± 0.49 b
JK147-1	Mango	<i>mangiferaeindicae</i> (I)	9.5	6.97 ± 0.48 a	7.34 ± 0.27 e	5.80 ± 0.67 c
A5-1	Mango	<i>mangiferaeindicae</i> (I)	9.5	6.70 ± 0.61 a	7.53 ± 0.16 d	6.00 ± 0.84 cd
CFBP 2939	Br. pepper	<i>mangiferaeindicae</i> (I)	9.5	4.21 ± 0.51 cd	4.82 ± 0.21 g	7.86 ± 0.29 a
CFBP 2912	Mango	<i>anacardii</i> (II)	9.6	4.68 ± 0.69 b	7.92 ± 0.34 ab	3.38 ± 0.45 e
CFBP 2913	Mango	<i>anacardii</i> (II)	9.6	4.11 ± 1.16 d	7.92 ± 0.26 a	5.72 ± 0.14 c
CFBP 2914	Mango	<i>anacardii</i> (II)	9.6	4.99 ± 1.33 bc	7.93 ± 0.22 a	5.82 ± 0.32 c
JY542	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	4.71 ± 1.06 bc	7.80 ± 0.19 abc	3.21 ± 0.93 ef
LA98	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	3.65 ± 0.39 de	7.66 ± 0.25 c	5.27 ± 0.53 d
LA99	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	3.61 ± 0.70 de	7.80 ± 0.22 abc	2.58 ± 0.39 g
LA100	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	2.90 ± 0.78 f	7.73 ± 0.22 b	2.83 ± 0.83 f
LA101	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	3.53 ± 0.81 de	7.83 ± 0.14 ab	2.96 ± 0.47 f
LA102	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	3.18 ± 1.43 f	7.70 ± 0.13 c	2.66 ± 1.04 f
LA103	Cashew	<i>anacardii</i> (II)	9.6	3.33 ± 1.22 ef	7.45 ± 0.27 de	2.57 ± 0.66 g
CFBP 2547	Ambarella	<i>spondiae</i> (III)	9.4	4.72 ± 0.86 b	6.01 ± 0.43 f	2.94 ± 0.63 ef

TABLE 4. Population sizes recorded from leaf lesions 35 days after inoculation of three host species with xanthomonads originating from *Anacardiaceae* and identified as AFLP group 9.4, 9.5 and 9.6 of *Xanthomonas axonopodis*

¹ Pathogenicity groups are given in brackets.

² This study. Group numbers as defined in (142, 143).

³ Pathotype strain.

⁴ Population sizes were determined on NCTM3 semi-selective medium, except for strain CFBP 2547 (modified Wilbrink's medium). Eight lesions per strain-host combination were used for population size assessment. Each value represents log-transformed cfu ml⁻¹.

⁵ Standard deviation, based on two replicated experiments.

⁶ Strain comparisons based on Mann-Whitney tests. Population size values with the same letter(s) did not differ significantly (P =0.05).

On Brazilian pepper, the only strains that induced lesions in which large population sizes (7×10^7 to 2×10^8 cfu per lesion - Tables 4 and 5) were recorded were group I strains

originating from Brazilian pepper. All other strains induced lesions in which populations sizes were significantly smaller, but a larger diversity in population size was found on this host species (Tables 4 and 5). Within group I strains, although population sizes obtained for mango strains were significantly lower than those obtained for Brazilian pepper strains, the former strains still reached relatively high levels, ranging from 4×10^5 to 6×10^6 cfu per lesion (Table 5).

Strain	Host of origin	Country of origin	RFLP group ¹	Species inoculated	
				Mango	Brazilian pepper
CFBP 2935	Mango	Australia	C	$6.68^2 \pm 0.26^3$ c ⁴	6.69 ± 0.26 cd
CFBP 1716 ⁵	Mango	India	C	7.14 ± 0.23 b	6.61 ± 0.45 cd
JK147-1	Mango	Philippines	B	7.02 ± 0.48 b	5.81 ± 0.66 ef
A5-1	Mango	Réunion	A	7.38 ± 0.38 a	5.79 ± 0.64 f
CFBP 2932	Mango	Réunion	A	7.58 ± 0.33 a	5.56 ± 0.67 f
CFBP 2933	Mango	Réunion	C	7.38 ± 0.32 a	6.75 ± 0.41 c
JV1121	Mango	South Africa	ND	6.69 ± 0.31 c	6.35 ± 0.51 de
CFBP 2938	Brazilian pepper	Réunion	D	4.26 ± 0.50 d	7.97 ± 0.14 b
CFBP 2939	Brazilian pepper	Réunion	D	3.62 ± 0.46 f	8.16 ± 0.22 a
CFBP 2940	Brazilian pepper	Réunion	D	3.85 ± 0.44 e	7.99 ± 0.30 b
JP742	Brazilian pepper	Réunion	D	7.10 ± 0.60 b	8.21 ± 0.18 a
JP758	Brazilian pepper	Réunion	D	4.19 ± 0.42 d	8.06 ± 0.32 ab

TABLE 5. Population sizes recorded from leaf lesions 35 days after inoculation of two host species with pathogenicity group I strains (AFLP group 9.5)

¹ From (61) – ND: not determined.

² Population sizes were determined on KC semi-selective medium. A total of eight lesions per strain-host combination was used for population size assessment. Each value represents log-transformed cfu ml⁻¹.

³ Standard deviation, based on two replicated experiments.

⁴ Strain comparisons based on Mann-Whitney tests. Population size values with the same letter(s) did not differ significantly (P =0.05).

⁵ Pathotype strain.

Pathogenicity tests on ambarella and mombin. Both strains originating from ambarella induced a severe dieback of inoculated ambarella plants. No symptom was observed after inoculation of strain *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* CFBP 1716 or CFBP 2913. On

mombin, less severe symptoms were observed. The two strains originating from ambarella induced twig lesions that were approximately 70 to 80 mm in length one month after inoculation, whereas the two strains originating from mango did not cause any lesions. Typical slow-growing non-pigmented colonies were successfully reisolated from assayed lesions.

DISCUSSION

We used AFLP, a technique that has been extensively used to investigate the species classification of the genus *Xanthomonas* (88, 142, 158), intrapathovar assessment of genetic diversity (23, 144), and epidemiology (85). Recently, this technique was given emphasis for species delineation in bacterial taxonomy (173). Based on AFLP data, the pathovar *mangiferaeindicae* was genetically heterogeneous and consisted of three distinct groups of strains. Genetic diversity between strains within group I and group II was low, with maximum EGD values of 0.014 and 0.022 nucleotide substitutions per site, respectively. These values are consistent with those previously published for *X. arboricola* pv. *pruni* (23) and *X. axonopodis* pv. *allii* (158). AFLP results further suggested that the provisional designation of strains of pv. *mangiferaeindicae* as members of *X. campestris* requires revision, as evolutionary genome divergence of strains of this pathovar with the type strain of *X. campestris* was always higher than 0.130 nucleotide substitutions per site. Likewise, the EGD value between the pathotype strain of *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* and the type strain of *X. axonopodis* was 0.149 nucleotide substitutions per site. Indeed, EGD values between strains of *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* and strains of *X. axonopodis sensu* Vauterin (187) were variable, ranging from approximately 0.03 to 0.15 nucleotide substitutions per site.

AFLP data, which shows a good correlation with DNA:DNA hybridization data (142), allowed the allocation of pv. *mangiferaeindicae* strains within genetic groups of *X. axonopodis*, as defined by Rademaker (143). The pathotype strain of pv. *mangiferaeindicae*, together with all strains isolated from *Anacardiaceae* in the Old World (designated herein as group I) were genetically related to *X. axonopodis* group 9.5 (composed of pvs. *citri*, *malvacearum*, *glycines...*), whereas strains isolated from mango and cashew in Brazil (designated herein as group II) were genetically related to *X. axonopodis* group 9.6 (composed of pvs. *aurantifolii*, *phaseoli* var. *fuscans*, *vignicola...*). Finally, strains isolated from ambarella in the French West Indies (designated herein as group III) were genetically related to *X. axonopodis* group 9.4 (composed of pvs. *dieffenbachiae*, *manihotis*, *phaseoli...*).

One aim of this paper was to clarify the pathovar classification of xanthomonads associated with *Anacardiaceae*. Pathovar *mangiferaeindicae* was originally characterized as a pathogen of mango (48). In the original description of this pathogen (125), inoculation of other genera in the *Anacardiaceae* with mango strains suggested these as putative host species although disease had not been observed on them in the field. In this early report, pathogenicity was probably assessed solely on the basis of lesion development after inoculation and no disease was observed in the field on non-mango host species.

AUDPC has been used to quantify pathogenicity tests under controlled environmental conditions. Among xanthomonads, AUDPC was primarily used on vascular pathogens (5, 30, 112, 145), and large AUDPC values were interpreted as successful interactions involving an aggressive pathogen and a susceptible host species. We used AUDPC for characterizing interactions involving foliar pathogens. Interestingly, successful interactions, as determined by population sizes in leaf lesions 35 dai, were characterized by low AUDPC values due to delayed lesion development. Conversely, large AUDPC values, due to early lesion development, were correlated with low population sizes 35 dai. This can be interpreted as a moderately efficient expression of host defense mechanisms (responsible for the marked population drop observed later during the interaction) rather than a high susceptibility to the pathogen. These results agree with previous data indicating that lesion development after inoculation with group I strains was faster on a partially resistant (cv. Heidi) than on a susceptible (cv. Haden) mango cultivar (139).

Xanthomonads isolated from mango and cashew in Brazil (designated as group II in this study) were originally included in *pv. mangiferaeindicae* (152). They formed a homogenous group based on their host range, symptomology and internal population sizes in leaf lesions on the three *Anacardiaceae* genera used in this study. When two mango cultivars with different genetic backgrounds were inoculated with these strains, the resulting pathogenicity phenotypes were distinct from those caused by group I strains : leaf lesions were flat, larger AUDPC values were attained and bacterial population sizes were of 1×10^4 to 1×10^5 cfu per lesion, typical of interactions involving non-host species, resistant cultivars or interactions involving casual pathogens (16, 50, 71). Similar population sizes were recovered from black lesions one month after inoculation of mango leaves in an incompatible interaction with *X. vesicatoria* CFBP 1545 (O. Pruvost, *unpublished data*). The atypical symptomology described herein on mango leaves for group II strains is consistent with the markedly different disease expression reported in the field on mango leaves, fruits and twigs in Brazil vs. the Old World (62, 163). When cashew was inoculated with group II strains, bacterial population sizes in leaf lesions ranged from 3×10^7 to 9×10^7 cfu per lesion, typical of a

compatible interaction (16, 50, 71). Interestingly, cashew originated from Northeastern Brazil (115), whereas mango originated from Asia (117). Brazil appears to be the only country in which epidemics caused by xanthomonads have been reported on cashew (123). Cashew may therefore be the primary host species of xanthomonads genetically related to *X. axonopodis* group 9.6 and isolated from cashew and mango in Brazil. In contrast, data from our study suggest that the pathogen is casual on mango cvs. Haden and Maison Rouge, although field observations from Brazil suggest that the susceptibility of mango to this pathogen may be cultivar-dependent (J. R. Neto, *unpublished data*). Further quantitative pathogenicity tests are needed to test this hypothesis. Symptomology differences between group II and group I (including the pathotype strain) strains warrant different pathovar designations, as was previously done for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* (48). The proposed pathovar designation for the group II strains is *Xanthomonas axonopodis* pv. *anacardii*, as these strains from Brazil shared a high genetic relatedness with members of *X. axonopodis* group 9.6 by AFLP (syn. *X. fuscans sensu* Schaad *et al.* (165, 166)). The relationships between pv. *anacardii* and *X. fuscans* should be evaluated in the future using a polyphasic approach. The proposed common name for the associated disease is cashew bacterial spot. The two available yellow-pigmented xanthomonads isolated from mango in Brazil are not included within *X. axonopodis* pv. *anacardii*, as the EGD values between the non-pigmented and the yellow-pigmented strains differed by more than 0.10 nucleotide substitutions per site (i.e. these strains should likely not be classified as *X. axonopodis*).

Similarly, when mango, cashew or Brazilian pepper were inoculated with strain CFBP 2547 (group III) originating from ambarella, the resulting lesions were small, flat, black, and necrotic. Population sizes recovered from leaves lesions on these three *Anacardiaceae* were 5×10^4 , 1×10^6 and 9×10^2 cfu per lesion, respectively. Group III strains induced a severe dieback of ambarella, consistent with previous data (155) and induced extensive twig lesions on mombin. Therefore, group III strains, which are genetically related to *X. axonopodis* group 9.4, induced a unique symptomology on *Spondias* spp., a characteristic that warrants their being designated as *Xanthomonas axonopodis* pv. *spondiae*.

Consequently, we propose that the pv. *mangiferaeindicae* epithet be used for characterizing strains truly pathogenic to mango and strains pathogenic to Brazilian pepper (group I strains). We propose that these strains be classified in a single pathovar, as there was a broad variation of population sizes between strains of the same host origin, resulting in a situation where there was less difference in pathogenicity on a given host between the most aggressive heterologous strain and the least aggressive homologous strain than between the

least and the most aggressive strains of one type. Moreover, differences in population sizes measured for homologous and heterologous interactions appeared strain-dependent.

These strains shared a high level of genetic relatedness with several pathovars of *X. axonopodis* group 9.5 (syn. *X. citri sensu* Schaad *et al.* (166)). We propose that these strains be provisionally named *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* until the relationships between pv. *mangiferaeindicae* and *X. citri* is evaluated by a polyphasic approach. To avoid confusion with the disease caused by *X. axonopodis* pv. *anacardii*, we recommend that the disease caused by *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* be referred to as mango bacterial canker (58, 167) (consistent with the branch cankers and the raised leaf and fruit lesions induced by this pathogen) rather than mango bacterial black spot.

The three proposed *Xanthomonas* pathovars associated with *Anacardiaceae* can be clearly distinguished by the means of phenotypic (137), isozyme (171), RFLP (61) and AFLP (this study) analyses.

The genetic diversity of *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* was assessed, based on AFLP analysis of 328 strains isolated from mango in different countries and from Brazilian pepper in Reunion Island. The multidimensional scaling representation showed three groups of strains which are largely consistent with those previously described using the RFLP technique with two probes : an avirulence gene of the *avrBs3* family and the insertion sequence *IS1595* (61). Both AFLP and RFLP strongly suggested interregional or international migration events. Eleven different haplotypes were identified in more than a single country. This involved South Africa, New Caledonia, Australia, Réunion Island and Mauritius. Probably more countries were concerned by introduction of new strains from foreign countries, but these events were not detected in our study, primarily because the sample size markedly varied among countries. It is likely that some strains today present in Réunion Island were introduced from South Africa, as there were many mango budwood introductions in Réunion Island from South Africa in the 1970s, for which the quarantine conditions are not known. Similarly, there are propagative material exchanges between Réunion Island and its neighbor Mauritius. This could explain why both islands shared identical haplotypes. *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* can survive asymptotically in association with mango buds. It was previously shown, using a marked strain, that populations present in/or mango buds were responsible for subsequent leaf lesions on the neo-formed leaves (138).

Description of *Xanthomonas axonopodis* pv. *anacardii*

Xanthomonas axonopodis pv. *anacardii* [a.na'car.di.i N.L. adj. *anacardii* from *Anacardium* , the genus of cashew (*Anacardium occidentale* L.)].

Based on AFLP, the bacterium is genetically related to members of *X. axonopodis* group 9.6 *sensu* Rademaker (143). Its genome does not contain IS1595-like elements. Strains of pv. *anacardii* can also be distinguished from pvs. *mangiferaeindicae* and *spondiae* by isozyme analysis (171).

On cashew, characteristic leaf lesions induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *anacardii* start as small, angular, watersoaked spots, which extend and eventually coalesce. Lesions turn into necrotic, flat, dark brown spots. No lesions have been reported on other plant organs. On mango, the bacterium produces necrotic, flat, dark brown to black spots, but in contrast with cashew, no initial watersoaked lesions were observed after inoculation of cvs. Maison Rouge and Haden. One month after inoculation, small population sizes (typically 10^4 cfu per lesion) can be recovered from mango leaf lesions, whereas large population sizes (typically 10^7 cfu per lesion) can be recovered from cashew leaf lesions. Few reports from Brazil mentioned mango fruit lesions (163), and they described black, depressed and rounded lesions of different sizes. Some lesions only display depressions, with no other external changes, but show an internal pulp decay consisting in tissue discoloration sometimes associated with a pulp rot(163). Therefore, symptomology on mango fruit is also markedly different from that reported for pv. *mangiferaeindicae*, as no internal breakdown was observed for this pathogen (62). Finally, *Xanthomonas axonopodis* pv. *anacardii* induces unique twig symptoms, i.e. yellow to brown lesions, which subsequently longitudinally crack and evolve as a generalized dieback of the youngest vegetative flush (163). Based on pathogenicity tests and field observations, mango (*Mangifera indica* L.) and Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) are not susceptible host species of *Xanthomonas axonopodis* pv. *anacardii*.

The proposed neopathotype strain is ICMP 4088 (International Collection of Micro-organisms from Plants, New Zealand), = CFBP 2913 (Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, France).

Description of *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*

Xanthomonas axonopodis pv. *mangiferaeindicae* [man'gi.fe.rae.'in.di.cae N.L. adj. *mangiferaeindicae* from *Mangifera indica* L., the latin binomial of mango].

Based on AFLP, the bacterium is genetically related to members of *X. axonopodis* group 9.5 *sensu* Rademaker (143). Its genome contains a large number of copies of IS1595-like elements. Strains of pv. *mangiferaeindicae* can also be distinguished from pvs. *anacardii* and *spondiae* by isozyme analysis (171).

Bacterial canker affects all aerial parts of the mango plant. The bacterial pathogen can

infect through wounds and natural openings. Leaf and fruit symptoms are most common, but twig and branch cankers may occur when infection is severe (i.e., on highly susceptible cultivars). Leaf symptoms begin as small water-soaked spots delineated by veins, becoming raised, black, sometimes with a chlorotic halo. Individual lesions are usually smaller than 0.5 cm², but they may coalesce to form larger necrotic areas. One month after inoculation, population sizes ranging from 1 x 10⁶ to 1 x 10⁸ cfu per lesion can be recovered from mango leaf lesions on susceptible cultivars. Several months after infection, leaf lesions dry and turn light brown ash-gray. Severe leaf infection may result in early abscission. Fruit symptoms appear as small water-soaked spots on lenticels. These spots later become star-shaped, erumpent, and exude an infectious gum. Often, a "tear stain" infection pattern is observed on the fruit. Severe fruit infections will cause premature fruit drop. Twig cankers are potential sources of inoculum and weaken branch resistance to winds, but such lesions seem to occur only when climatic events (such as tropical storms) are responsible for massive inoculum redistribution and wounds. The disease is not systemic and does not affect the root.

Although inducing leaf lesions after inoculation, *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* has never been isolated in the field from *Anacardium* spp. and *Spondias* spp. Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) is considered a host species of *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*, although a host specialization occurs for most, but not all, strains.

The pathotype strain is ATCC 11637 (American Type Culture Collection, MD USA) = CFBP 1716 (Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, France) = ICMP 5740 (International Collection of Micro-organisms from Plants, New Zealand) = BCCM-LMG 941 (Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms, Belgium) = NCPPB 490 (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK).

Description of *Xanthomonas axonopodis* pv. *spondiae*

Xanthomonas axonopodis pv. *spondiae* [‘spon.di.ae N.L. adj. *spondiae* from *Spondias*, the genus of ambarella (*Spondias cytherea* Sonn.) and mombin (*Spondias mombin* L.)].

Based on AFLP, the bacterium is genetically related to members of *X. axonopodis* group 9.4 *sensu* Rademaker (143). Its genome does not contain IS1595-like elements. Strains of pv. *spondiae* can also be distinguished from pvs. *anacardii* and *mangiferaeindicae* by isozyme analysis (171).

On ambarella, characteristic leaf lesions induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *spondiae* start as small, angular, watersoaked spots, which extend and eventually coalesce. Lesions

turn into necrotic, flat, dark brown spots, sometimes delineated by the veins. On stems, water-soaked lesions, which turn into extensive cankers, are frequently found. Orange gummy exudates oozing from twig cankers are frequently observed. Numerous twig cankers can induce a severe die-back of ambarella trees. No fruit lesions have been reported. Based on pathogenicity tests, *Spondias mombin* displayed similar symptoms, but appeared less susceptible to the pathogen. In the French West Indies, the only territory where *Xanthomonas axonopodis* pv. *spondiae* has been reported to date (155), no lesions were observed on mango trees.

The proposed neopathotype strain is CFBP 2547 (Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, INRA Angers, France), = LMG (Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms, University of Ghent, Belgium).

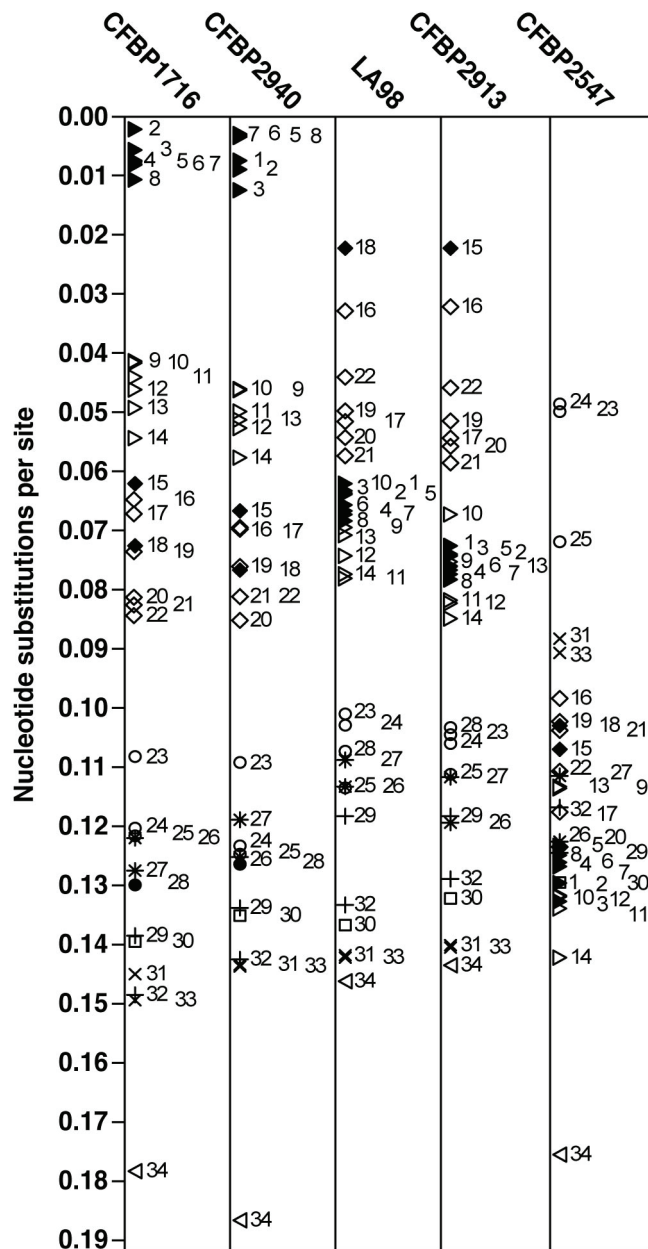


Fig. 1. Representation of genetic distances based on evolutionary genome divergence (EGD), expressed as the number of nucleotide substitutions per site and calculated between xanthomonads isolated from *Anacardiaceae*, strains representative of groups 9.1 to 9.6 of *Xanthomonas axonopodis* and the type strain of *Xanthomonas campestris*. Symbols are as follows. 5: group 9.1; *: group 9.2; +: group 9.3; O: group 9.4; ▷: group 9.5; ◇: group 9.6; □ *X. campestris* and ◁ unknown species. Symbols filled with solid black are for strains isolated from *Anacardiaceae*. Strain numbers are as follows. 1: CFBP 1716 (pathotype strain of pv. *mangiferaeindicae* - from mango - 9.5); 2: CFBP 2917 (from mango - 9.5); 3: JR749 (from mango - 9.5); 4: CFBP 2940 (from Brazilian pepper - 9.5); 5: JR606-2 (from Brazilian pepper - 9.5) 6: CFBP 2938 (from Brazilian pepper - 9.5); 7: JR606-1 (from Brazilian pepper 9.5); 8: JR537-6 (from Brazilian pepper - 9.5); 9: CFBP 2525

(*X. a. pv. citri* - 9.5); 10: LMG 558 (*X. a. pv. cajani* - 9.5); 11: LMG 712 (*X. a. pv. glycines* - 9.5); 12: LMG 761 (*X. a. pv. malvacearum* - 9.5); 13: LMG 9045 (*X. a. pv. clitoriae* - 9.5); LMG 8014 (*X. a. pv. phaseoli* - 9.4); 14: LMG 937 (*X. a. pv. vitians* - 9.5); 15: LA98 (from cashew - 9.6); 16: CFBP 2866 (*X. a. pv. aurantifolii* - 9.6); 17: LMG 867 (*X. a. pv. sesbaniae* - 9.6); 18: CFBP 2913 (from mango - 9.6); 19: LMG 8021 (*X. a. pv. rhynchosiae* - 9.6); 20: LMG 828 (*X. a. pv. vignicola* - 9.6); 21: LMG 936 (*X. a. pv. vigniaeradiatae* - 9.6); 22: LMG 7511 (*X. a. pv. phaseoli* var. *fuscans* - 9.6); 23: LMG 7455 (*X. a. pv. phaseoli* - 9.4); 24: LMG 695 (*X. a. pv. dieffenbachiae* - 9.4); 25: CFBP 2603 (*X. a. pv. manihotis* - 9.4); 26: CFBP 6369 (*X. a. pv. allii* - 9.2); 27: LMG 811 (*X. a. pv. patelii* - 9.2); 28: CFBP 2547 (from ambarella - 9.4); 29: LMG 899 (*X. a. pv. vasculorum* - 9.3); 30: LMG 568^T (*X. c. pv. campestris* - type strain of *X. campestris*); 31: LMG 551 (*X. a. pv. begoniae* - 9.1); 32: LMG 7303 (*X. a. pv. begoniae* - 9.1); 33: LMG 982^T (*X. a. pv. axonopodis* - type strain of *X. axonopodis* - 9.3); 34: CFBP 2924 (mango from Brazil, yellow pigmented colonies).

FIRST REPORT IN MYANMAR OF *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV.
MANGIFERAEINDICAE CAUSING MANGO BACTERIAL CANKER ON *MANGIFERA*
INDICA L.

N. Ah-You, L. Gagnevin and O. Pruvost, CIRAD-Université de la Réunion, UMR PVBMT, Saint Pierre, La Réunion, F-97410 France; Myint, N.T., Plant Protection Division, Myanmar Agriculture Service, Ministry of Agriculture and Irrigation, Gyogon Insein P.O. Bayintnaung Rd., Yangon, Myanmar; G. I. Johnson, Horticulture 4 Development, PO Box 412 Jamison ACT 2614, Australia.

Bacterial canker of mango (or bacterial black spot), caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (1) is a disease of economic importance in tropical and subtropical producing areas. *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* can cause severe infection in a wide range of mango cultivars, and induces raised, angular, black leaf lesions sometimes with a chlorotic halo. Several months after infection, leaf lesions dry and turn light brown ash-gray. Severe leaf infection may result in abscission. Fruit symptoms appear as small water-soaked spots on lenticels. These spots later become star-shaped, erumpent, and exude an infectious gum. Often, a "tear stain" infection pattern is observed on the fruit. Severe fruit infections will cause premature fruit drop. Twig cankers are potential sources of inoculum and weaken branch resistance to winds (2).

Suspected leaf lesions of bacterial canker were collected from mango nursery stock cv. Yin Kwe at a nursery in Yangon, Myanmar in March, 2007. Non-pigmented *Xanthomonas*-like bacterial colonies were isolated on KC and NCTM3 semi-selective agar media. Amplified Fragment Length polymorphism (AFLP) analysis was performed on three isolates from Myanmar, and additional reference isolates of xanthomonads originating from *Anacardiaceae* (*X. axonopodis* pv. *anacardii*, *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*, *X. axonopodis* pv. *spondiae* and *X. translucens* strains from pistachio), using *SacI*/*MspI* and four primer pairs (unlabeled *MspI* + 1 (A, C, T or G) primers and 5'-labeled - *SacI* + C primer for the selective amplification step) (1). Based on multidimensional scaling (1), the Myanmar isolates were identified as *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*, and were most closely related to group B strains, which were isolated from mango in India and Eastern Asia (2). Mango cv. Maison Rouge leaves, inoculated as previously reported (1) with the Myanmar isolates, showed typical symptoms of bacterial canker a week after inoculation. One month

after inoculation, mean population sizes ranging from 5×10^6 to 8×10^6 cfu per lesion were recovered from leaf lesions, typical of a compatible interaction (1). *Mangifera indica* L. probably evolved in the area that includes north western Myanmar (3) and this is the first confirmed detection of *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* from Myanmar. Further surveying and collection would be necessary to evaluate its geographic distribution and prevalence in the country.

References: (1) N. Ah-You *et al.* Phytopathology 97:000, 2007. (2) L. Gagnevin & O. Pruvost Plant Dis. 85:928, 2001. (3) S.K. Mukherjee. *In* The Mango, Botany, Production and Uses. Ed. R.E. Litz pp. 1–19, CAB International: Wallingford, UK, 1997.

Chapitre III

Les pathovars
mangiferaeindicae et
anacardii font partie de la
nouvelle espèce
Xanthomonas citri

CHAPITRE III

LES PATHOVARS *MANGIFERAINDICAE* ET *ANACARDII* FONT PARTIE DE LA NOUVELLE ESPECE *XANTHOMONAS CITRI*

Le chapitre III a fait l'objet d'une publication soumise en juillet 2007 :

Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to Anacardiaceae and their relatedness to different *Xanthomonas* species

N. Ah-You, L. Gagnevin, P. Grimont, S. Brisse, X. Nesme, F. Chiroleu, L. Bui Thi Ngoc, E. Jouen, P. Lefeuvre, C. Vernière and O. Pruvost, soumis, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*

Les principaux points de cet article sont discutés ci-dessous.

1. Problématique

Comme nous l'avons démontré dans le chapitre II, le pathovar *mangiferaeindicae*, regroupant des souches de *Xanthomonas* isolées sur différents hôtes parmi les Anacardiaceae, se divise en trois lignées identifiées comme trois pathovars distincts : *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*, *X. axonopodis* pv. *anacardii* et *X. axonopodis* pv. *spondiae* sur la base de données génétiques (AFLP) et de données de pouvoir pathogène. Les données AFLP indiquent que ces trois pathovars sont liés génétiquement à trois sous-groupes de l'espèce *X. axonopodis*. Toutefois, ces mêmes données indiquent que ces trois pathovars sont génétiquement très différents de la souche type de l'espèce *X. axonopodis*. Aussi, ces différents résultats préliminaires nous ont amenés à nous interroger sur les relations des souches isolées d'anacardiaceae entre elles d'un point de vue taxonomique, mais aussi sur leur position par rapport aux 24 espèces génomiques du genre *Xanthomonas*.

Pour répondre à ces différentes questions nous avons décidé d'adopter une approche polyphasique de la taxonomie bactérienne, comme recommandé lors du dernier comité de taxonomie (173).

2. Méthodologie

Une collection contenant les souches types des 24 espèces de *Xanthomonas*, ainsi que des souches de plusieurs pathovars de l'espèce *axonopodis* et des souches de *Xanthomonas*

isolées de différentes Anacardiacees ont été utilisées dans cette étude. Voir liste en annexe p.137 (Tableau 6).

Pour une approche polyphasique de la taxonomie des souches associées aux Anacardiacees, la démarche suivante a été adoptée :

- Utilisation du génotypage par une analyse AFLP, pour comprendre les relations des souches isolées d'Anacardiacees par rapport aux souches types des 24 espèces du genre *Xanthomonas* et des souches de différents pathovars de l'espèce *X. axonopodis*. Les AFLP ont été répétées deux fois avec deux jeux d'ADN distincts pour s'assurer de la reproductibilité des résultats. Le calcul des EGD (« Evolutionary Genome Divergence »), exprimées en nombre de substitutions de nucléotides par site permet de comparer ces souches entre elles.
- Utilisation de « Multilocus Sequence Analysis » (MLSA), pour comprendre les relations phylogénétiques de ces souches entre elles et avec les autres *Xanthomonas*. Trois gènes ont été séquencés (*atpD*, *dnaK* et *gyrB*) pour sept espèces génomiques (*X. fragariae*, *X. vesicatoria*, *X. axonopodis*, *X. gardneri*, *X. perforans* et *X. euvesicatoria* (91, 187)).
- Enfin, étude de la position taxonomique des souches pathotypes des *pathovars mangiferaeindicae*, *anacardii* et *spondiae* par comparaison d'homologie ADN/ADN et calcul de la stabilité thermique des hybrides (ΔT_m) avec un groupe de souches d'espèces génomiques de *Xanthomonas*, sélectionnées grâce aux données AFLP et MLSA. Les hybridations ont été répétées au moins deux fois et effectuées en doubles réciproques pour les souches marquées : CFPB 1716 (souche type de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*), CFBP 2525 (souche type de *X. axonopodis* pv. *citri*) et LMG 982^T (souche type de l'espèce *X. axonopodis*).

3. Résultats et discussion

3.1. AFLP et MLSA

Les analyses par AFLP et par MLSA des souches isolées d'Anacardiacees et de souches appartenant au genre *Xanthomonas* confirment les résultats obtenus dans le chapitre II. Ainsi, les souches de trois pathovars (*anacardii*, *spondiae* et *mangiferaeindicae*) sont génétiquement liées aux souches de l'espèce *axonopodis*. Pour autant, les données AFLP démontrent que les souches isolées d'Anacardiacees sont très différentes de la souche type de *X. axonopodis*. Ces trois pathovars forment trois lignées distinctes au sein de l'espèce

axonopodis : les souches du pathovar *spondiae* se regroupent avec les souches du sous-groupe 9.4, les souches du pathovar *mangiferaeindicae* avec celles du sous-groupe 9.5 et les souches du pathovar *anacardii* avec celles du sous-groupe 9.6 (143).

A partir de ces données, un nombre restreint de souches types d'espèces génomiques et de souches types de pathovars de l'espèce *X. axonopodis* ont été choisies pour être hybridées avec la souche CFBP 1716 (pv. *mangiferaeindicae*). Les souches d'espèces apparemment éloignées du pathovar *mangiferaeindicae* n'ont pas été sélectionnées pour la suite de l'étude. Etant donné le faible nombre de souches du pathovar *spondiae* dont nous disposons (deux souches) et les difficultés techniques que pose l'extraction de son ADN pour l'hybridation nous n'avons pas inclus ces souches dans les travaux de classification. De même, nos données AFLP/MLSA ont montré que les souches isolées de pistachier se rapprochent du « translucens-core », confirmant les résultats de Facelli *et al.* (53, 54). Nous n'avons donc pas inclus ces souches dans les travaux d'hybridation, afin de privilégier le positionnement taxonomique des souches du pathovar *mangiferaeindicae* et du pathovar *anacardii*.

3.2. Détermination de la position taxonomique

Les deux éléments clés de la technique d'hybridation ADN/ADN pour la distinction des espèces sont les valeurs seuil de 70% d'homologie ADN/ADN et 5°C pour le ΔT_m . Si l'homologie entre deux souches est supérieure à 70% et le ΔT_m inférieur à 5°C, elles appartiennent à des espèces identiques.

Nos travaux ont montré que :

- Les pathovars *mangiferaeindicae*, *anacardii* et *citri* (agent du chancre bactérien des agrumes) appartiennent à la même espèce, ce qui confirme nos résultats et ceux de Rademaker (143) qui suggèrent que les groupes 9.5 et 9.6 sont apparentés
- Le pathovar *mangiferaeindicae* n'appartient à aucune espèce actuellement définie
- Les pathovars *mangiferaeindicae*, *anacardii* et *citri* ne sont pas apparentés à la souche type de l'espèce *axonopodis* et donc n'appartiennent pas à cette espèce

La comparaison de résultats des homologies ADN/ADN, de l'AFLP et MLSA nous permet de confirmer les travaux de Schaad *et al.*, qui proposent l'élévation de l'agent pathogène du chancre bactérien des agrumes au rang d'espèce, sous le nom de *X. citri*. Ils suggèrent par ailleurs que les souches actuellement rangées dans les groupes 9.5 et 9.6 de l'espèce *axonopodis* font partie de l'espèce *citri*.

Ces résultats ne permettent cependant pas de valider la proposition de Schaad *et al.* d'élever au rang d'espèce les souches *X. axonopodis* 9.6 sous le nom de *X. fuscans*.

Ce travail de positionnement taxonomique des souches isolées d'Anacardiacees répond aux exigences de la définition d'une espèce car elle suit les recommandations des comités de taxonomie (173, 192). Plusieurs techniques ont été combinées pour cette approche polyphasique : l'AFLP, technique qui génère des marqueurs neutres et qui permet d'analyser l'ensemble du génome bactérien de manière globale, et le MLSA, qui permet d'analyser un petit nombre de gènes de ménage avec le niveau élevé d'information fourni par une séquence nucléotidique. Ces deux techniques ont l'avantage de faciliter l'analyse et la comparaison de larges collections bactériennes, alors que les homologues ADN/ADN ne peuvent être mesurés que pour un petit nombre de souches. L'apport de ces techniques a été considérable pour étudier de manière rapide les relations phylogénétiques des souches isolées d'Anacardiacees par rapport aux 24 espèces génomiques du genre *Xanthomonas*. Les résultats issus de ces analyses, exécutées avant l'étape des hybridations ADN/ADN, ont permis de délimiter un groupe d'espèces génomiques de *Xanthomonas* proches des souches à positionner et de vérifier que les souches à positionner sont bien représentatives du groupe que l'on veut caractériser. Ce premier travail de typage a donc facilité le travail d'hybridation en réduisant le nombre de souches à marquer et à comparer par hybridations ADN/ADN et par le calcul de la stabilité thermique des hybrides (ΔT_m), qui sont les techniques de référence à l'heure actuelle pour la définition de l'espèce. Ce travail de sélection de souches à hybrider a été d'autant plus capital qu'il s'est avéré par la suite difficile d'extraire certains ADN en quantité nécessaire pour mener la technique d'hybridation ADN/ADN (souche type de *X. axonopodis* à croissance lente, avec production de polysaccharides en excès gênant la purification d'ADN et le marquage).

Nos travaux montrent que les souches des pathovars *mangiferaeindicae* et *anacardii* sont de la même espèce que *X. axonopodis* pv. *citri*. Comme il a déjà été dit dans ce chapitre, l'affectation de ce pathogène au sein de l'espèce *X. axonopodis* n'est pas valide. En 2005, Schaad et son équipe créent une polémique lorsqu'ils proposent de renommer ce pathogène *X. smithii*, en s'appuyant sur des données d'hybridations ADN/ADN (technique nucléase S1-TCA) mais dans des conditions stringentes ($T_m -15^\circ\text{C}$). Du point de vue de la nomenclature bactérienne, cette dénomination de l'agent pathogène du chancre bactérien des agrumes est

invalide, car le nom de *X. citri* avait déjà été proposé et restait disponible en cas de ré-élévation de cette bactérie au rang d'espèce (59). De ce fait, Schaad a rectifié sa proposition en utilisant le nom légitime de *X. citri*. Nos données confirment cette proposition, comme cela a déjà été dit dans ce chapitre, d'autant plus que nous avons utilisé la même méthode (nucléase S1-TCA) dans des conditions de stringence inférieures que celles de Schaad *et al.* (Tm - 25°C), comme recommandé pour un tel travail de taxonomie (90, 186). De plus, nos données s'appuient sur des valeurs de ΔT_m qui s'avèrent être plus fiables pour le positionnement taxonomique (69, 70).

Dans ce chapitre, nous avons pu montrer que deux sous-groupes de l'espèce *X. axonopodis sensu* Rademaker (9.5 et 9.6) pourraient être considérés comme des sous-espèces de *X. citri* (*X. citri* subsp. *citri* et *X. citri* subsp. *fuscans*), car les souches de ces deux sous-groupes appartiennent à la même espèce d'après les données de ΔT_m , et qu'elles constituent bien deux entités distinctes au sein de cette espèce, caractérisables par différentes techniques (AFLP, MLSA, rep-PCR). Récemment, les espèces et les sous-espèces proposées par Schaad *et al.* ont été validées (52). Les implications d'une classification en sous-espèces au sein du genre *Xanthomonas* devront donc être évaluées (co-existence ou remplacement avec la classification en pathovars...). Notre étude soulève la question de la taxonomie de l'espèce *X. axonopodis*. Cette espèce regroupe de nombreux pathovars, et montre une très grande hétérogénéité (143, 157, 187, 189). Notre étude, mais aussi d'autres travaux avant elle (91, 165), montrent qu'au sein de cette espèce sont regroupées des bactéries qui supportent une reclassification et une ré-élévation au rang d'espèce. Certaines souches des sous-groupes génétiques proposés par Rademaker *et al.* sont très différentes de la souche type de *X. axonopodis*, rendant invalide leur classification au sein de cette espèce. Aussi, des travaux complémentaires devraient être rigoureusement effectués afin de statuer sur la position taxonomique des souches regroupées au sein de cette espèce.

Devant l'ampleur du travail à effectuer, des approches par AFLP et MLSA pourraient apporter des données intéressantes, car elles ont l'avantage de pouvoir discriminer ces souches et de pouvoir s'appliquer sur de larges populations.

4. Conclusion

Nos résultats montrent la pertinence des recommandations de Wayne *et al.* et Watckebrandt *et al.* pour une taxonomie polyphasique (172, 192). Une telle approche offre plusieurs avantages : aide aux choix de souches dans des collections parfois hétérogènes,

meilleure compréhension de la diversité d'un groupe taxonomique pour l'ensemble de ses représentants, complémentarité des données qui améliore la robustesse des conclusions.

Concernant les deux pathovars que nous avons étudiés, nous proposons donc la classification comme suit :

- *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae*, agent du chancre bactérien du manguier
- *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, agent de la maladie des taches nécrotiques de l'anacardier

Et nous confirmons la classification de l'agent du chancre bactérien des agrumes comme *Xanthomonas citri* pv. *citri*.

POLYPHASIC CHARACTERIZATION OF XANTHOMONADS PATHOGENIC TO ANACARDIACEAE AND THEIR RELATEDNESS TO DIFFERENT *XANTHOMONAS* SPECIES

N. Ah-You¹, L. Gagnevin¹, P.A.D. Grimont², S. Brisse², X. Nesme³, F. Chiroleu¹, L. Bui Thi Ngoc¹, E. Jouen¹, P. Lefeuvre¹, C. Vernière¹ and O. Pruvost¹.

¹ CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7, chemin de l'Irat, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France.

² Unité Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes, Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux, 75724 Paris, Cedex 15, France.

³ Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557/USC INRA 1193, Université Claude Bernard-Lyon 1, Villeurbanne, France.

ABSTRACT

Xanthomonads cause several diseases of *Anacardiaceae*, including Mango Bacterial Canker (MBC) (also called Mango Bacterial Black Spot), which is a major threat for mango industries. Bacteria causing these diseases were not included in any recent taxonomic study on the genus *Xanthomonas*. We used Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Multilocus Sequence Analysis (MLSA) and DNA-DNA hybridization (DDH) in a polyphasic approach to characterize xanthomonads associated to this plant family and to evaluate their relatedness to *Xanthomonas* species. AFLP and MLSA results showed congruent phylogenetic relationships of the causal agent of MBC with strains of *Xanthomonas axonopodis* subgroup 9.5 *sensu* Rademaker, which includes *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Similarly, strains causing Cashew Bacterial Spot in Brazil were related to *X. axonopodis* subgroup 9.6. Based on thermal stability of DNA reassociation and consistent with AFLP and MLSA data, the recent proposal to elevate *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* to species level as *Xanthomonas citri* is supported by our data. The causal agents of Mango Bacterial Canker and Cashew Bacterial Spot should be classified as pathovars of *Xanthomonas citri*, namely *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (pathotype strain CFBP 1716) and *X. citri* pv. *anacardii* (pathotype strain CFBP 2913), respectively. Finally, our results suggest that pathovars presently classified as *X. axonopodis* and belonging to subgroups 9.5 and 9.6 should be

reclassified as pathovars of *X. citri* and do not support the elevation of *X. axonopodis* subgroup 9.6 as *X. fuscans*.

INTRODUCTION

Mango Bacterial Canker (MBC) (also called Mango Bacterial Black Spot) is one of the most important bacterial diseases for mango (*Mangifera indica* L.) industries worldwide (62). MBC was first described in 1915 in South Africa (45) but may have originated from India, as the disease was observed in herbarium specimens collected in Bihar in 1881 (125, 126). The causal agent of MBC was first reported as "*Bacillus mangiferae*" (45), then, in 1948, designated as "*Pseudomonas mangiferae-indicae*" (125, 126). In the 1970s, the pathogen was named *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (152), in compliance with the international standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria (48).

Some species of the plant pathogenic genus *Xanthomonas* are subdivided into pathovars. The pathovar classification established by Dye *et al.* (48) and reviewed by Young *et al.* (198) is an infrasubspecific classification applied to bacterial plant pathogens by reference to their host range or to their capacity to cause distinctive symptoms. Pathogenicity tests are an essential part of this classification. Pathovar names have no standing in nomenclature and were primarily developed for plant protection regulators and quarantine officers (198).

In 1995, a reclassification of the genus *Xanthomonas* by a polyphasic approach including DNA-DNA hybridization (DDH) assigned strains into 20 genomospecies (187). More recent data increased the number of genomospecies to 27 (11, 91, 181). Studies based on 16S rRNA gene sequences showed that several genomospecies, as determined by DDH shared more than 99 % identity, making this technique inadequate for species identification in the genus *Xanthomonas* (79, 114). Rademaker *et al.* (142) showed that amplified length polymorphism analysis (AFLP) and repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) data positively correlated with DDH. These two genotyping techniques can be used for routine species identification and can be included in a polyphasic scheme for describing new species or combinations (143, 158, 173).

One of the *Xanthomonas* genomospecies, *X. axonopodis*, displayed a higher intra-specific heterogeneity based on DDH as well as AFLP and rep-PCR data and six genetic clusters were described within this species (142, 143). Some members of these genetic clusters were elevated to the species rank (*X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. alfalfae*, *X. citri* and *X. fuscans*) (11, 12, 91, 165, 166). These assignments were based on a polyphasic approach including DDH experiments using the nuclease S1 procedure (37) performed at a temperature of $T_m - 15$ °C.

Several former *X. campestris* pathovars, including pathogens of major economic importance such as pv. *mangiferaeindicae*, were not included in the reclassification by Vauterin *et al.* (187) or more recent ones. Based on AFLP data, we showed recently (7) that the designation of the causal agent of MBC as *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* was incorrect and that mango strains allocated into this pathovar were genetically related to two different lineages of *X. axonopodis sensu* Rademaker (142, 143). Furthermore, variations in pathogenicity within this group support its separation into two distinct pathovars, pv. *anacardii*, the causal agent of Cashew Bacterial Spot (CBS) and pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of MBC. A third group of strains, designated as pv. *spondiae*, causes a dieback of ambarella in the French West Indies (7).

DDH is until now the gold standard method in bacterial taxonomy (192). AFLP, a technique also recommended for bacterial taxonomy (173), was useful for evaluating the species status of several genera (1, 100, 116, 179), including xanthomonads (23, 88, 142, 158). Recently, multilocus sequence analysis (MLSA), based on sequence analysis of several housekeeping genes, has been developed for species delineation (65, 75, 77, 148). MLSA has the advantage to analyze phylogenetic relationships at the population level, while DDH generates only pairwise comparisons of strains.

The purpose of this study was to perform a polyphasic characterization, based on DDH, AFLP and MLSA, of the pathovar *mangiferaeindicae sensu* Dye and evaluate its relatedness to different *Xanthomonas* species. We show that the causal agent of MBC is genetically related to *X. axonopodis* group 9.5. Our data support the elevation of *X. axonopodis* pv. *citri* as *X. citri* and show that the causal agents of MBC and CBS should be classified as pathovars of this new genomospecies, namely *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* and *X. citri* pv. *anacardii*, respectively.

METHODS

Bacterial strains and media. *Xanthomonas* strains isolated from several plant genera within *Anacardiaceae*, the type strains of 24 *Xanthomonas* species (91, 182, 187) and some additional *Xanthomonas axonopodis* pathovars were used in this study (Supplementary Table A). Some strains included in this study were deposited in the Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP, INRA Angers, France), the BCCM/LMG (Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms, University of Ghent, Belgium) and the National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB, CSL, York, United Kingdom). Cultures were stored as lyophils and/or in a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ freezer; they were checked for purity and most of them routinely cultivated on YPGA (yeast extract 7 g l^{-1} , peptone

7 g l⁻¹, glucose 7 g l⁻¹, agar 18 g l⁻¹, propiconazole 20 mg l⁻¹, pH 7.2) at 28 °C, except *X. populi* which was grown at 19 °C. Strains growing poorly on YPGA were cultivated on modified Wilbrink medium (154).

AFLP analysis. Genomic DNA was extracted from bacteria using the DNeasy[®] tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions and DNA concentrations were estimated by fluorometry (TKO 100 Fluorometer, Hoefer, San Francisco). AFLP analysis was performed as described previously except that four primer combinations (varying for the selective nucleotide of the *MspI* primer –Table 1) were used (85). All adaptators and PCR primers used were synthesized by Applied Biosystems and are described in Supplementary Table B. To test the reproducibility of the AFLP technique, two independent DNA extractions were used for all strains, and strain 306 of *X. axonopodis* pv. *citri* (40) was used as a control in each AFLP experiment.

Ligation adaptators	sequence 5' > 3'
A1MSP	GACGATGAGTCCTGAG
A2MSP	CGCTCAGGACTCATC
A1SAC	CTCGTAGACTGCGTACAAGCT
A2SAC	TGTACGCAGTCTACG
Preamplification primers	sequence 5' > 3'
PMSP	GATGAGTCCTGAGCGG
PSAC	TAGACTGCGTACAAGCTC
Selective amplification primers	sequence 5' > 3'
SMSPN	GATGAGTCCTGAGCGG + A, C, T, or G
labelled selective amplification primers	sequence 5' > 3'
SSACCF	6-FAM [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC
SSACCV	VIC [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC
SSACCN	NED [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC
SSACCP	PET [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC

Table 1. AFLP primers and adaptators used in this study

The presence and absence of fragments were scored as a binary matrix, and analyzed with the R software (Version 2.3.1; R Development Core Team, Vienna, Austria). The threshold for assigning a peak was set to 200 relative fluorescence units. Evolutionary genome divergences (EGD) were calculated from Dice similarity indices and corrected to account for unobserved substitutions by using the standard Jukes-Cantor model, which assumes equal rates of substitution between all pairs of bases (116, 131). EGD values were used as

distances to construct a weighted neighbor-joining tree (63, 162) using the R software. The robustness of the tree was assessed by bootstrap (1000 resamplings).

Gene amplification and sequencing. Amplification of 16S rRNA genes was performed by PCR as described by Nesme *et al.* (120) using the specific primers FGPS6 (5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3') and FGPS1509 (5'-AAGGAGGGGATCCAGCCGCA-3') for strains CFBP 1716, CFBP 2913 and CFBP 2547 (pathotype strains for *pv. mangiferaeindicae*, *anacardii* and *spondiae*, respectively) (7). Amplified fragments were purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and cloned into pGEM-T easy plasmid as recommended by the manufacturer (Promega). Sequence data were obtained by primer walking double-strand analysis (Sequencia) using primers T7 and SP6 which flank the cloning region in the pGEM-T easy plasmid. Sequence data were compared to those of other xanthomonads (79, 158, 181) by alignment using the Clustal X software (180). Comparisons were based on a partial sequence of 1,475 bp corresponding to the shortest region published for *Xanthomonas* type strains (i.e. *X. populi* X95922).

Gene portions of *dnaK*, *atpD* and *gyrB* (Table 1) were amplified by PCR using the BD advantage 2 polymerase mix kit (Clontech), as recommended by the manufacturer. PCR reactions were performed in a PE9600 thermocycler (Applied Biosystems) as follows: heating to 95 °C for 3 min and 35 cycles of denaturation for 1 min at 95 °C, annealing for 1 min at 66 °C and extension for 1 min at 68 °C, followed by a final extension step at 68°C for 7 min. For a small number of strain-gene combinations, annealing temperature was modified (63-68 °C) for optimal PCR quality or yield. The PCR products were sequenced by Macrogen. The *dnaK*, *atpD* and *gyrB* sequences from *Stenotrophomonas maltophilia* K279a (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_maltophilia/) were used as an outgroup.

Phylogenetic analyses of housekeeping genes. DNA sequences for each gene (*dnaK*, *atpD* and *gyrB*) were aligned using Clustal W based sub-alignment tool (180) available in MEGA 3.1 program (96). Tajima's D (177), which tests the hypothesis that observed mutations are selectively neutral by measuring differences between the population mutation rates and the average number of nucleotides differences, was performed for each gene portion using DnaSP, version 4.0 (159). The Nei and Gojobori method (119) was used for evaluating the synonymous/non synonymous substitution (Ka/Ks) ratios using Svaap software version 1.0.2 (<http://www.bacteriamuseum.org/SWAAP/SvaapPage.htm>). The nucleotide and amino acid identities and transition/transversion ratios were also evaluated using Svaap software. Detection of potential recombinant sequences, identification of likely

parental sequences, and localization of possible recombination breakpoints was carried out on concatenated sequences alignment using the rdp, geneconv, bootscan, maximum chi square, chimaera and sister scan recombination detection methods as implemented in the RDP3 software (110). The analysis was performed with default settings for the different detection methods and a Bonferroni corrected P-value cutoff of 0.05. Recombination events were accepted when detected with three detection methods or more. The breakpoint positions and recombinant sequence(s) inferred for every detected potential recombination event were visually checked and adjusted where necessary using the extensive phylogenetic and recombination signal analysis features available in RDP3.

Maximum likelihood trees were calculated for each of the three genes using PAUP* (version 4.0b10). The Shimodaira-Hasegawa (S-H) method (168), as implemented in PAUP*, was used to test whether the tree topologies based on each locus fall within the same confidence limits.

Phylogenetic analyses including Neighbour-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) trees of the alignment of concatenated genes were conducted both in PAUP* and in PHYML (72). The model of substitution was chosen using the R software and the APE package implemented in R (124), and PHYML. Bootstrap analyses were made with 1000 replicates for NJ and ML. For the Bayesian approach, MrBayes software (version 3.1.2) (84) was used. Two runs with four Markov chains (using default heating values) consisted of 7.0×10^6 generations starting from a random initial tree were run simultaneously and sampled every 100 generations. Variations in the ML scores in these samples were examined graphically using the Tracer software (<http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software.html?id=tracer>). Trees generated prior to stabilisation of ML scores were discarded (burn-in of 10 %).

The S-H test was also used to compare tree topologies (NJ, ML and Bayesian methods) based on concatenated data.

DNA-DNA hybridization. DNA was extracted and purified according to Brenner *et al.* (27), except for the type strain of *Xanthomonas axonopodis* (LMG 982), for which DNA was extracted using the CTAB method (14). Native DNAs of the type strain of *X. axonopodis* (LMG 982^T) and of pathotype strains of pv. *mangiferaeindicae* (CFBP 1716) and pv. *citri* (CFBP 2525) were labelled *in vitro* with tritium-labelled nucleotides by random priming using the Megaprime DNA labelling system 1604 (GE Healthcare). The S1 nuclease-trichloroacetic acid method used for DNA-DNA hybridization experiments was described by Grimont *et al.* (70), except that hybridizations were performed for 24 hours instead of 16 hours. The

reassociation temperatures used were 70 °C and 75 °C. DNA-DNA hybridization experiments were performed twice.

Thermal stability of DNA reassociation. For strains sharing reassociations values between 50 and 70 %, the thermal stability of DNA was determined (37, 69). This technique allows the determination by interpolation of the DNA T_m (thermal denaturation midpoint), which is the temperature at which half of the reassociation of the DNA is obtained. The T_m value depends on both DNA base composition and ionic strength: the T_m of a DNA can be lowered by decreasing the sodium molarity (69). This property was used to reduce artificially the theoretical T_m of our strains (102 °C after calculations). After 24 hour-long hybridizations at 75 °C or 70 °C, in 0.42 M NaCl, the hybridization mixture was diluted two-fold, in order to have a sodium molarity of 0.2M, which decreased the T_m by 5 °C. Then, as described by Grimont (69), the temperature was raised by 5 °C increments (from 80 °C to 100 °C). At each step a sample was taken, and nuclease S1 buffer, containing 0.67 M of NaCl in order to obtain the 0.42M of sodium required for nuclease S1 digestion, was added. Further steps of T_m determination were similar to the original method (37, 69). ΔT_m or divergence corresponds to the difference between the T_m of a homologous reaction and the T_m of a heterologous reaction (69).

RESULTS

AFLP analysis. The phylogenetic tree (Fig. 1), based on 1300 AFLP fragments, showed that all *Xanthomonas* genomospecies were placed in distinct clusters, supported by high bootstraps values (> 80 %) (Fig. 1). Strains identified as pathovars of *X. axonopodis* were distributed in six clusters, corresponding to subgroups 9.1 to 9.6 *sensu* Rademaker. Each subgroup was supported by bootstrap values above 80 %. Strains associated with *Anacardiaceae* were heterogeneous and grouped in three of the six subgroups in *X. axonopodis*. Among strains pathogenic to *Anacardiaceae*, pathovar *mangiferaeindicae* from mango and Brazilian pepper was most closely related to subgroup 9.5, with EGD \geq 0.042 nucleotide substitutions per site (nsps) and constituted a new clade within this subgroup (bootstrap 100 %). Pathovar *anacardii* from cashew and mango grouped with strains identified as subgroup 9.6 (with EGD \geq 0.025 nsps), and pathovar *spondiae* from ambarella was most closely related to subgroup *axonopodis* 9.4 (with EGD \geq 0.048 nsps). Minimal and maximal EGD values between strains of *Xanthomonas* genomospecies were 0.097 nsps (between *X. codiae* LMG8678^T and *X. cassavae* LMG673^T) and 0.275 nsps (between *X. sacchari* LMG472 and *X. arboricola* pv. *pruni* LMG852). The type strain of

X. axonopodis (LMG 982) had EGD values of 0.129, 0.149 and 0.118 nsps with the pathotype strain of pathovars *anacardii* (CFBP 2913), *mangiferaeindicae* (CFBP 1716) and *spondiae* (CFBP 2547), respectively.

Mean EGD value among 15 strains of pathovar *mangiferaeindicae* was 0.010 nsps (sd = 0.0029). Mean EGD value among 4 strains of pathovar *anacardii* was 0.016 nsps (sd = 0.0093). Within subgroup 9.5, pathovar *mangiferaeindicae* (n = 15) was most closely related to pathovar *citri* (n = 9) with a mean EGD of 0.050 nsps (sd = 0.0026). Within subgroup 9.6, strains of pathovar *anacardii* were most closely related to *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (mean EGD = 0.030 nsps; sd = 0.0032). Strains of pathovar *spondiae* were most closely related to the pathotype strain of *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (subgroup 9.4), with an EGD of 0.048 nsps.

Multilocus sequence analysis. The nucleotide identity of the three gene portions ranged from 96.53 % (*gyrB*) to 96.94 % (*atpD*) (Table 2). The nucleotide transitions exceeded transversions, with ratios ranging from 1.47 (sd = 1.50) (*atpD*) to 3.51 (sd = 2.77) (*gyrB*).

Gene	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>dnaK</i>
Function	F1-F0-ATPase ® subunit	DNA gyrase subunit ®	70-KDa Heat Shock Protein (Hsp70)
Length	747 bp	773 bp	762 bp
Nucleotide identity (%)	96.94 %	96.53 %	96.80 %
Amino acid identity (%)	99.26 %	99.53 %	99.67 %
Ts/Tv *	1.4728 (1.4973)	3.5051 (2.7682)	3.1231 (0.7842)
Ka †	0.0083 (0.0072)	0.0021 (0.0031)	0.0015 (0.0014)
Ks †	0.1242 (0.0741)	0.1682 (0.1056)	0.1512 (0.0809)
Ka/Ks †	0.0672 (0.0465)	0.0122 (0.0196)	0.0102 (0.0245)
Tajima's D	-0.488‡	-0.652‡	-0.184‡

Table 2. Sequence variations within *Xanthomonas* strains used in this study for three housekeeping genes.

* Transition and transversion ratio determined using Kimura's 2-Parameter method (94). Values in brackets are standard deviations.

† Synonymous and non-synonymous substitutions rate determined using the Nei & Gojobori method (119). Values between parentheses are standard deviations.

‡ Not significant (p > 0.10).

The Ka/Ks ratios of the three genes ($\ll 1$) indicated that these genes are under purifying selection. No recombination event was detected within *X. axonopodis*.

The S-H test performed on ML trees from each gene showed that the topologies of *atpD*, *dnaK* and *gyrB* ML trees fell within the same confidence interval (1000 bootstraps). ML trees based on single gene sequences (*atpD*, *dnaK* and *gyrB*) allowed a distribution of xanthomonads originating from *Anacardiaceae* (i.e. *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae sensu Dye*) in three different lineages (data not shown).

Each tree showed that strains of pathovars *mangiferaeindicae* and *anacardii* grouped with strains of subgroup 9.5 and 9.6, respectively, whatever the analysed gene. Subgroups 9.5 and 9.6 were always closely related, an association supported by high bootstrap values ($\geq 80\%$) for *atpD* and *gyrB* (data not shown). Strains identified as pv. *spondiae* grouped with subgroup 9.1 (*gyrB*) or subgroup 9.4 (*atpD* and *dnaK*) (data not shown).

When using concatenated sequences, the general time reversible (GTR) model with gamma (Γ) variations and a proportion of invariable sites (I) was the most suitable model, based on Akaike information criterion. This model was used for building NJ, ML and Bayesian trees. The three methods gave congruent results in tree topologies, supported by high bootstrap and probability values. Based on the S-H test, the best tree likelihood was obtained with the ML method. All strains of *X. axonopodis sensu* Vauterin, together with *X. euvesicatoria* and *X. perforans*, clustered in a very robust but heterogeneous group. Consistent with data from single gene sequences, strains of pvs. *mangiferaeindicae* and *anacardii* grouped with strains belonging to subgroups 9.5 and 9.6, respectively (Fig. 2).

Distance matrices calculated with the model GTR+ Γ +I, based on concatenated sequences allowed us to assess relationship between strains. Distances within subgroup 9.5 were very low (≤ 0.004 nsps). Subgroups 9.5 and 9.6 were closely related to each other with a mean sequence distance of 0.022 nsps (sd = 0.002). As an example, distance between the pathotype strain of pvs. *mangiferaeindicae* and *anacardii* both pathogenic to *Anacardiaceae* was 0.020 nsps. *X. axonopodis* subgroup 9.5 did not constitute a robust clade, whereas the clade composed of subgroups 9.5 and 9.6 did (Fig. 2). Mean distance values between subgroup 9.5 and other *X. axonopodis* subgroups (9.1 to 9.4) ranged from 0.036 to 0.047 nsps. Strains of pv. *spondiae* were equidistantly related to subgroups 9.1 (0.020 nsps) and 9.4 (0.019 to 0.023 nsps). The latter two subgroups were closely related, with a mean sequence distance of 0.023 nsps (sd = 0.002).

Distances between the pathotype strains of pathovars *mangiferaeindicae*, *anacardii*, *spondiae* (pathogenic to *Anacardiaceae*) and the type strain of *X. axonopodis sensu* Vauterin were 0.041, 0.048 and 0.045 nsps, respectively. These strains from *Anacardiaceae* were

also distantly related to the type strain of the newly vadedited *Xanthomonas* species (*X. perforans*, *X. euvesicatoria* and *X. gardneri*), with distances ranging from 0.033 to 0.078 nsps.

DNA-DNA hybridization and ΔT_m values. The percentage of DNA reassociation between pathovar *mangiferaeindicae* pathotype strain CFBP 1716 (labelled) and the type strains of most selected species of the genus *Xanthomonas* was below 40 %. ΔT_m values obtained between CFBP 1716 and the type strain of *X. oryzae*, *X. melonis* and *X. axonopodis* were $> 5.0^\circ\text{C}$ (Table 3). Other ΔT_m results (Table 3) indicated that the pathotype strain of *X. axonopodis* pvs. *citri* (CFBP 2525), *anacardii* (CFPB 2913) and *mangiferaeindicae* (CFBP 1716) should not be classified as members of *X. axonopodis* and should be classified as a single species.

Strain	Current nomenclature	Relative binding (%) with labelled DNA from CFBP 1716 *	ΔT_m (°C) with labelled DNA from CFBP 1716 *	ΔT_m (°C) with labelled DNA from CFBP 2525 *	ΔT_m (°C) with labelled DNA from LMG 982 †
LMG8678 †	<i>X. codiae</i>	23	ND ‡	ND	
LMG911 †	<i>X. vesicatoria</i>	22	ND	ND	
LMG568 †	<i>X. campestris</i>	39	ND	ND	
LMG8670 †	<i>X. melonis</i>	56	11.0	ND	
LMG876 †	<i>X. translucens</i>	9	ND	ND	
LMG471 †	<i>X. sacchari</i>	11	ND	ND	
CFBP4188 †	<i>X. cynarae</i>	29	ND	ND	
LMG673 †	<i>X. cassavae</i>	31	ND	ND	
LMG5047 †	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	58	7.5	ND	
LMG 982 †	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	ND	7.5	7.0	
CFBP 1716 *	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	ND		1.5	4.5
CFBP 2940	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	ND	0.5	ND	
CFBP 2525 *	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	ND	1.0	ND	6.0
CFBP 2913 *	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>anacardii</i>	ND	2.0	ND	7.0
LA98	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>anacardii</i>	ND	2.5	ND	ND
LMG 7387	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>cajani</i>	ND	3.5	ND	ND

Table 3. Levels of DNA reassociation between the pathotype strain of pathovar *mangiferaeindicae* and type strains of selected *Xanthomonas* species and pathovars.

* Pathotype strain.

† Type strain.

‡ Not determined.

Sequencing of the 16S rRNA gene. A fragment of approximately 1.5 kb was amplified from all strains. The DNA sequence of strains CFBP 1716 (pv. *mangiferaeindicae*), CFBP 2547 (pv. *spondiae*) and CFBP 2913 (pv. *anacardii*) shared more than 99 % similarity with members of the *X. campestris* rDNA core and was more distantly related to the *X. sacchari* and *X. translucens* core. Sequence data obtained for CFBP 1716 differed from strains CFBP 2913 and CFBP 2547 by six and five nucleotides, respectively. It was most closely related to that of *X. axonopodis* pv. *citri* (NC003919) and *X. vasicola* (Y10755), with a sequence difference of one nucleotide. In contrast, sequence data of strains CFBP 2913 and CFBP 2547 were most closely related to that of *X. perforans* (AF123091) or *X. euvesicatoria* (AF123089), the two latter being 100 % identical. They differed by three and four nucleotides, respectively.

DISCUSSION

For the last decade, the genus *Xanthomonas* has been the object of several taxonomic studies (79, 91, 142, 143, 165, 181, 187), but until now, none of them included the pathovar *mangiferaeindicae*, an important threat for the mango industry (5th fruit crop species in worldwide production in 2004 - <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>). Our study aimed at accurately assess the taxonomic position of this pathogen. The International Committee on the Systematics of Prokaryotes (ICSP) recommended (173) that genotyping and sequencing methods be used to supplement DNA-DNA hybridizations. We used AFLP and MLSA on a broad strain collection to define a limited set of strains to be used in DDH experiments and to examine relationships of these strains with *Xanthomonas* species and infraspecific genetic clusters of *X. axonopodis* (142, 158). MLSA, a powerful sequence-based method applied to housekeeping genes for species delineation (32, 65, 109, 148), has the advantage over DDH (which only allows pairwise comparisons of strains) to analyze phylogenetic relationships at a population scale and is undoubtedly superior to genotyping techniques in terms of portability. AFLP has the advantage to generate a large number of randomly located markers over the whole genome. AFLP was successfully used for phylogenetic analyses and taxonomy of several bacterial genera (1, 82, 87, 116, 121, 179), including xanthomonads (88, 142, 158, 165). Based on AFLP data, EGD or current genome mispairing (CGM) provide a measurement of genetic divergences between genomes (116). Variations in pathogenicity within *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae sensu* Dye support its partition into three pathovars, namely pv. *mangiferaeindicae*, pv. *anacardii* and pv. *spondiae* (7). In the present study, AFLP and MLSA were used to evaluate the relatedness of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae sensu* Dye to *Xanthomonas*

species. Data derived from both techniques were highly congruent. Pathovar *mangiferaeindicae*, which contains strains isolated from mango and Brazilian pepper in the Old World, was most closely related to subgroup 9.5 of *X. axonopodis*. Pathovar *anacardii* contained strains isolated from cashew and mango in Brazil, and was most closely related to subgroup 9.6 of *X. axonopodis*. The positioning of pathovar *spondiae* (isolated from ambarella in the French West Indies) into groups or species was more complicated, as these strains were most closely related to subgroup 9.4 of *X. axonopodis* by AFLP, but equidistantly related to subgroups 9.1 and 9.4 by MLSA. The future use of a larger set of genes in the MLSA scheme may clarify their classification.

Based on AFLP data, members of valid *Xanthomonas* species (as defined by Vauterin *et al.* (187)), diverged by more than 0.097 nsps and this figure corresponds to a DDH value of 50 %. Divergence between the type strain of *X. axonopodis sensu* Vauterin and strains of pathovars *anacardii* (subgroup 9.6) and *mangiferaeindicae* (subgroup 9.5) was more than 0.129 nsps, suggesting that their assignation to *X. axonopodis* would be incorrect.

Sequence-based analyses of the structure of the *Xanthomonas* genus have been previously published, but they either targeted the ribosomal operon (68, 79, 165) or a single housekeeping gene (39). To our knowledge, our study is the first step towards a MLSA scheme for the genus *Xanthomonas*. The three studied housekeeping genes (*dnaK*, *gyrB* and *atpD*) were under purifying selection, and no recombination event concerned members of *X. axonopodis sensu* Rademaker. Based on the S-H test, MLSA datasets for each of the three genes produced non-significantly different ML tree topologies, indicating that the described phylogenies were congruent. When using concatenated gene datasets, NJ, ML and Bayesian trees were of similar structures, with ML having the highest likelihood (S-H test). MLSA data (Fig. 2) were consistent with AFLP results (Fig. 1) and both techniques appeared to be powerful tools for studying the taxonomy of *Xanthomonas*.

Recently, Schaad *et al.* proposed the elevation of *X. axonopodis* pv. *citri* (subgroup 9.5) and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (subgroup 9.6) at species level (165, 166). These proposals were based on DDH data (nuclease S1-TCA method) under more stringent conditions (T_m -15 °C) than what is recommended and widely used (T_m -25 °C) (89). Furthermore, no ΔT_m data were presented by Schaad *et al.* (165). We used the same reassociation method (nuclease S1-TCA method), with less stringent conditions (T_m -25 °C), and strengthened our results, when appropriate, by evaluating thermal stability of DNA reassociation (ΔT_m), which is recommended for species delineation, especially when DDH values are in the range of 50 to 75 % (37, 69, 70). Based on AFLP data, ten genomospecies were selected (*X. axonopodis*, *X. codiae*, *X. vesicatoria*, *X. campestris*, *X. melonis*,

X. translucens, *X. sacchari*, *X. cynarae*, *X. cassavae*, and *X. oryzae*) for DDH experiments. When the pathotype strain of pathovar *mangiferaeindicae* was labelled, most species had DDH homologies lower than 40 %. ΔT_m values with the three species that were most closely related to pathovar *mangiferaeindicae* (*X. oryzae*, *X. melonis* and *X. axonopodis*) were larger than the widely accepted threshold of 5 °C for species delineation (192). The relationships between the pathotype strain of pathovars *mangiferaeindicae* and *citri* with the type strain of *X. axonopodis sensu* Vauterin were further examined. Whatever the labelled strain, ΔT_m values between the type strain of *X. axonopodis* and these two members of subgroup 9.5 were larger than 5 °C, the only exception being hybridization of *X. axonopodis* (labelled) to pv. *mangiferaeindicae*, which indicated a ΔT_m of 4.5 °C. Thus, our data confirms the proposal by Schaad *et al.* (166) that *X. axonopodis* pv. *citri* should be re-elevated to species rank, namely *X. citri* (ex Hasse 1915) Gabriel *et al.* 1989 emend.

Reciprocal DNA-DNA hybridization and thermal stability of DNA reassociation showed a close relationship between the pathotype strains of pathovars *mangiferaeindicae* and *citri*, indicating that these pathovars should both be part of the *X. citri* genomospecies. The distance between these two strains by AFLP and MLSA were 0.043 nsps and 0.004 nsps, respectively, fully consistent with ΔT_m results. Based on AFLP and MLSA data, all pathovars of *X. axonopodis* subgroup 9.5 formed a homogeneous group, with AFLP distances ranging from 0.042 to 0.065 nsps and MLSA distances lower than 0.010 nsps. Therefore, we propose that all pathovars presently identified as *X. axonopodis* subgroup 9.5 *sensu* Rademaker (143) be reclassified as pathovars of *X. citri*.

Values of ΔT_m between the pathotype strain of pathovar *mangiferaeindicae* and strains of pathovar *anacardii* CFBP 2913 and LA98 were 2.0 °C and 2.5 °C, respectively. These values are below the 5 °C threshold for species delineation (192), suggesting that their designation as separate species is not appropriate. These results are consistent with AFLP (EGD of 0.062 and 0.073 nsps, respectively) and MLSA (distances of 0.021 and 0.020 nsps, respectively) data. Our AFLP and MLSA results confirmed the genetic relatedness of *X. axonopodis* subgroups 9.5 and 9.6, already outlined using different AFLP conditions (142, 158) and rep-PCR (143). Recently, Schaad *et al.* proposed the elevation of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (subgroup 9.6) to species level as *X. fuscans* (165). Globally, our results derived from AFLP and MLSA (Table 4) do not support the classification of *X. axonopodis* subgroup 9.6 as *X. fuscans*. We propose that members of *X. axonopodis* subgroups 9.5 and 9.6 be classified as pathovars of *X. citri*.

	Pathovar name in group 9.5	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>					
		LMG 837		LMG 7511		LMG 8036	
		AFLP *	MLSA †	AFLP	MLSA	AFLP	MLSA
LMG 558 ‡	<i>cajani</i>	0.0737	0.0207	0.0789	0.0207	0.0761	0.0207
CFBP 2525 ‡	<i>citri</i>	0.0816	0.0231	0.0876	0.0226	0.0862	0.0231
306 (40)	<i>citri</i>	0.0787	0.0220	0.0846	0.0216	0.0832	0.0220
LMG 9045 ‡	<i>clitoriae</i>	0.0783	0.0212	0.0855	0.0207	0.0826	0.0212
LMG 9046 ‡	<i>desmodiilaxiflori</i>	0.0811	0.0233	0.0852	0.0229	0.0821	0.0233
LMG 712 ‡	<i>glycines</i>	0.0825	0.0219	0.0883	0.0214	0.0889	0.0219
LMG 8026	<i>glycines</i>	0.0887	0.0219	0.0913	0.0214	0.0919	0.0219
LMG 761 ‡	<i>malvacearum</i>	0.0792	0.0234	0.0817	0.0229	0.0822	0.0234
LMG 7429	<i>malvacearum</i>	0.0809	0.0234	0.0834	0.0229	0.0838	0.0234
CFBP 1716 ‡	<i>mangiferaeindicae</i>	0.0788	0.0207	0.0829	0.0203	0.0816	0.0207
JN570	<i>mangiferaeindicae</i>	0.0803	0.0207	0.0842	0.0203	0.0829	0.0207

Table 4. Genetic relatedness between members of *X. axonopodis* group 9.5 and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (group 9.6).

EGD (derived from AFLP) values of 0.062 and 0.073 nsps corresponded to distances (MLSA) of 0.021 and 0.020 nsps and to ΔT_m values of 2.0 and 2.5 °C, respectively. They were based on comparisons between the pathotype strain of pv. *mangiferaeindicae* (CFBP 1716) and two strains of pv. *anacardii* (LA98 and CFBP 2913).

* Data are evolutionary genome divergences (116) based on four combined AFLP conditions.

† Data are genetic distances based on the evolution model GTR+ Γ +I, based on concatenated sequences (124).

‡ Pathotype strain.

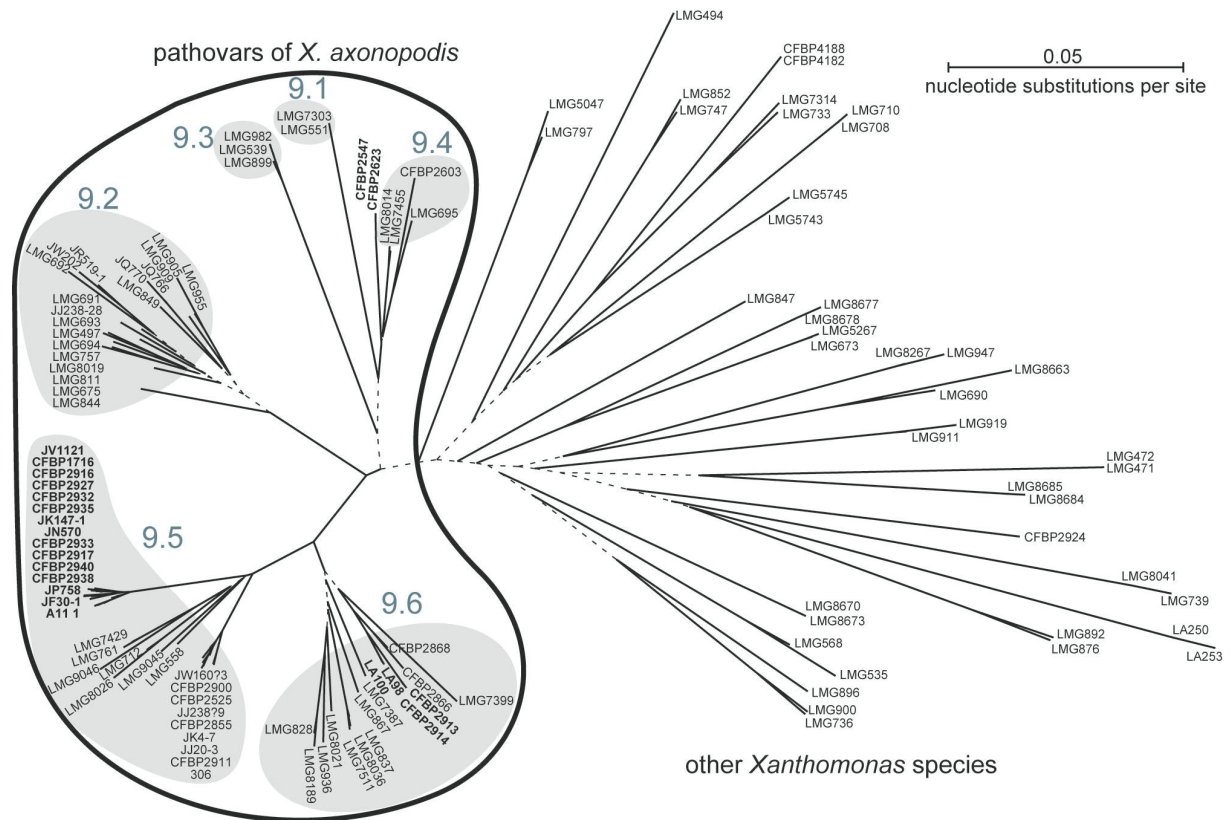


Fig. 1. Neighbor-joining tree derived from evolutionary genome divergences (116, 131) showing the relationships between *Xanthomonas* genomes and xanthomonads pathogenic to *Anacardiaceae* based on 1300 AFLP markers. Branches with bootstrap values lower than 80 % are represented by dotted lines.

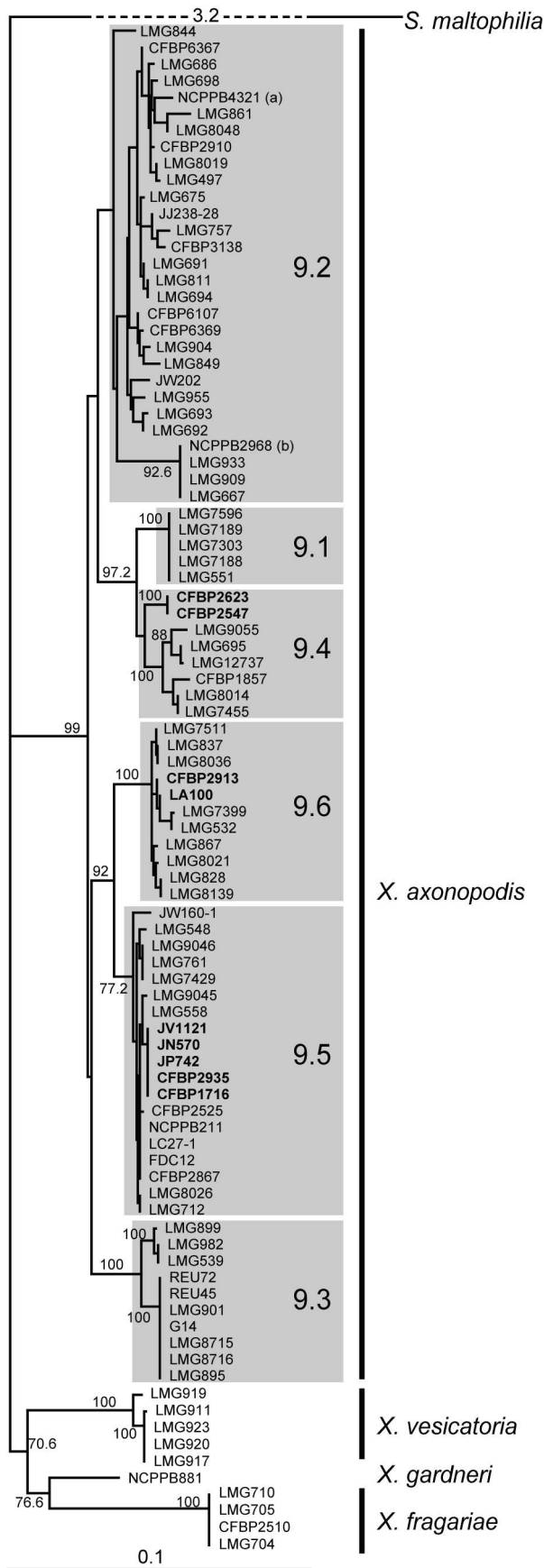


Fig. 2. Maximum likelihood tree derived from the GTR+ Γ +I model, based on concatenated *atpD*, *dnaK* and *gyrB* partial sequences, showing the relationships between *Xanthomonas axonopodis* subgroups (142, 143) and xanthomonads pathogenic to *Anacardiaceae*. (a) type strain of *Xanthomonas perforans*; (b) type strain of *Xanthomonas euvesicatoria* (11, 91).

Discussion générale

DISCUSSION GENERALE

L'objectif général de ce travail était de réviser la taxonomie des *Xanthomonas* associés aux Anacardiacees, bactéries non incluses dans les études récentes menées sur ce genre (142, 143, 187, 188). Pour ce faire, nous avons utilisé des méthodes récemment recommandées en taxonomie bactérienne (172), permettant d'intégrer la variabilité globale du taxon étudié, et de les comparer à la méthode de référence (hybridations ADN/ADN) (192). Plusieurs travaux ayant mis en évidence une absence de concordance entre des classifications basées sur des méthodes phylogénétiques et sur le pouvoir pathogène des *Xanthomonas* (143, 189, 190), nous avons utilisé le pathosystème *Xanthomonas*/Anacardiacees pour tester cette hypothèse.

Les travaux exposés dans cette thèse s'inscrivent dans la continuité des études précédemment menées sur la caractérisation des *Xanthomonas* associées aux Anacardiacees (61, 135, 137, 171). Parmi les principaux résultats issus de ces travaux, une assez grande diversité phénotypique et génétique entre les différents *Xanthomonas* isolés d'Anacardiacees a été mise en évidence. Nous avons caractérisé la complexité du pathovar *mangiferaeindicae* sensu Dye, en précisant sa gamme d'hôte, sa symptomatologie et son agressivité. Cette étude du pouvoir pathogène a été intégrée à une analyse polyphasique du pathovar (198).

Dans un premier temps (chapitre II), les souches de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* ont été analysées par AFLP, et ces données moléculaires ont mis en évidence l'existence de trois lignées distinctes, se regroupant au sein de trois sous-groupes de *X. axonopodis* sensu Rademaker. Les données de pouvoir pathogène mettent en évidence des gammes d'hôtes distinctes chez ces trois lignées. De plus, deux lignées distinctes ont été isolées de manguier, mais dans ce cas, des symptomatologies nettement différentes ont été observées. L'ensemble de ces résultats nous ont permis de classer ces souches en trois pathovars : *X. axonopodis* pv. *anacardii* (sous-groupe génétique 9.6, (143)) pour les souches isolées d'anacardier et de manguier au Brésil, *X. axonopodis* pv. *spondiae* (sous-groupe génétique 9.4) pour les souches isolées de prunier de Cythère et *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (sous-groupe génétique 9.5) pour les souches isolées de manguier dans l'ancien monde et de faux poivrier. Au sein du pathovar *mangiferaeindicae*, une spécialisation d'hôte a été parfois mise en évidence, mais l'existence de souches agressives à la fois sur manguier et faux poivrier nous a conduit à

penser que la création d'un nouveau pathovar pour les souches originaires du faux poivrier n'est pas pertinente.

La caractérisation de souches d'une collection mondiale de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* par AFLP a montré des résultats cohérents avec la caractérisation de ces souches par RFLP (61). L'utilisation d'une technique générant un grand nombre de marqueurs neutres comme l'AFLP a également révélé que les souches du pathovar *mangiferaeindicae* sont peu polymorphes. Ces résultats expliquent le très faible pouvoir discriminant mis en évidence par la méthode MLST (multi locus sequence typing) dans les phases préliminaires de ce travail. L'amélioration du pouvoir discriminant des méthodes d'analyse de la variabilité génétique entre ces souches devra donc cibler des loci possédant une horloge moléculaire plus rapide, comme les minisatellites.

L'utilisation conjointe de l'AFLP et du pouvoir pathogène pour caractériser ce groupe de souches souligne la non-conformité entre des classifications basées sur la phylogénie et sur le pouvoir pathogène. Cette question a déjà été soulevée par Vauterin *et al.* (190). Lors de la reclassification des *Xanthomonas* de 1995 (187), des espèces génomiques regroupant des souches ne partageant pas de caractères pathologiques communs ont été créés. Une même espèce génomique peut très bien rassembler des pathogènes causant des maladies différentes, sur des hôtes distincts. De même, des souches pathogènes sur le même hôte peuvent être génétiquement différentes. C'est le cas, par exemple, du pathovar *dieffenbachiae* dont les souches se distribuent dans les sous-groupes génétiques de *X. axonopodis* 9.4 et 9.6, ou encore du pathovar *phaseoli* et pathovar *phaseoli* variant *fuscans*, dont les souches sont aussi regroupées dans ces mêmes sous-groupes génétiques.

Dans le chapitre III, les *Xanthomonas* isolés d'Anacardiacees ont été caractérisés par une approche polyphasique, permettant la comparaison de données de génotypage (AFLP), de séquences de gènes de ménage (MLSA) à des résultats d'hybridation ADN/ADN et à des calculs de ΔT_m . L'analyse de l'ensemble de ces données nous a conduit à confirmer les travaux de Schaad *et al.* (164), qui ré-élevaient *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (sous-groupe *axonopodis* 9.5) au rang d'espèce, sous le nom de *Xanthomonas citri* (59). Nos résultats nous ont conduit à classer les souches isolées de manguier et de faux poivrier (sous-groupe *axonopodis* 9.5) au sein de l'espèce *X. citri*, sous le nom de *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*.

De même, les résultats AFLP et MLSA montrent une grande homogénéité entre tous les pathovars du sous-groupe génétique *axonopodis* 9.5, nous amenant à proposer la classification de l'ensemble de ces souches comme pathovars de l'espèce *X. citri*. Schaad *et al.*

ont proposé également que *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* soit ré-élevé au rang d'espèce et nommé *X. fuscans* (164). Or, nos résultats AFLP et MLSA montrent que les sous-groupes 9.5 et 9.6 sont génétiquement proches, confirmant les résultats obtenus dans d'autres études (143, 158). Les distances génétiques mesurées par AFLP et MLSA, ainsi que les valeurs de ΔT_m obtenues, indiquent que l'espèce *X. fuscans* ne possède pas les caractéristiques de l'espèce bactérienne, tel que défini par Wayne *et al.* (192). Nous proposons donc que l'ensemble des pathovars du sous-groupe 9.6 (incluant le pv. *anacardii*) soit également classé au sein de l'espèce *X. citri*.

Les propositions de Schaad *et al.* (164) ont été acceptées pendant l'écriture de cette thèse (52). Trois anciens pathovars de l'espèce *X. axonopodis* sont ré-élevés au rang d'espèce, chacune comportant des sous-espèces : *X. citri* subsp. *citri* (ex *X. axonopodis* pv. *citri*, 9.5), *X. citri* subsp. *malvacearum* (ex *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, 9.5), *X. alfae* subsp. *alfae* (ex *X. axonopodis* pv. *alfae*, 9.2), *X. alfae* subsp. *citrumelonis* (ex *X. axonopodis* pv. *citrumelo*, 9.2), *X. fuscans* subsp. *fuscans* (ex *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, 9.6) et *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, 9.6). Plusieurs questions sont soulevées avec la création de ces espèces, mais surtout avec l'utilisation de la classification en sous-espèces. La sous-espèce est l'échelon taxonomique le plus bas du code de nomenclature. Selon Wayne *et al.* (192), le classement en sous-espèces peut être utilisé pour des souches génétiquement très voisines mais présentant des variations phénotypiques. Or, Schaad *et al.* (164, 165) proposent des sous-espèces définies par des variations de séquences ITS. D'autre part, les sous-espèces proposées par Schaad *et al.* reprennent les noms des anciens pathovars. La question est donc de savoir si les sous-espèces créées sont destinées à remplacer la classification en pathovars ou si les deux classifications sont amenées à coexister. La classification en pathovar, à la différence de la sous-espèce, n'a aucune valeur taxonomique. Elle ne repose que sur des différences de pouvoir pathogène et des différences dans la gamme d'hôtes. La classification en pathovars constitue la base d'informations utilisées pour le classement d'organismes phytopathogènes sur les listes d'organismes de quarantaine ou sur les listes d'alerte. La coexistence de ces deux niveaux infrasubspécifiques risque fort de générer des confusions aux conséquences assez graves concernant la réglementation des échanges internationaux de végétaux.

Ces deux techniques apportent des éclairages complémentaires. L'AFLP permet d'explorer le génome dans son intégralité en générant des marqueurs neutres, de manière aléatoire alors que le MLSA, par l'étude de séquences partielles de gènes préalablement choisis, n'explore que la partie codante du génome sur un faible nombre de loci. A partir de nos résultats AFLP, nous avons pu déterminer que deux espèces génomiques de *Xanthomonas* valides sont divergentes d'au moins 0.097 substitutions de nucléotides par site (valeurs d'EGD), ce qui correspond à une valeur d'homologie ADN/ADN de 50% (187). D'autres études utilisant l'AFLP en taxonomie ont montré que la valeur seuil entre deux espèces génomiques valides dépendait du genre bactérien étudié (116). De même, nos résultats en MLSA permettent de séparer les espèces génomiques validées que nous avons choisi d'étudier. Ces deux techniques, AFLP et MLSA, se positionnent donc bien comme des techniques alternatives aux hybridations ADN/ADN pour délimiter des espèces bactériennes. Cependant, afin d'adopter ces deux techniques pour définir des espèces, il reste à résoudre la question du seuil qui séparerait deux espèces valides. Notre travail est le premier définissant clairement ce seuil chez le genre *Xanthomonas* pour la méthode AFLP. Des données supplémentaires sont en cours d'acquisition pour le définir pour la méthode MLSA.

Ces données nous ont permis d'évaluer la pertinence de reclasser les sous-groupes de *X. axonopodis* délimités par génotypage (143) hors de cette espèce. La divergence entre la souche type de *X. axonopodis* et les pathovars de l'espèce *X. axonopodis* est supérieure à la valeur seuil d'EGD de 0.097, suggérant que la grande majorité de ces pathovars (à l'exception du pv. *vasculorum*) n'appartient pas à l'espèce *X. axonopodis*. Ces résultats sont confirmés par la méthode MLSA. Chacun de ces groupes ne constitue pas pour autant une espèce. Ainsi, tel que décrit précédemment, les groupes 9.5 et 9.6 doivent être regroupés au sein d'une seule et même espèce, *Xanthomonas citri*. Il en est de même pour les groupes 9.1 et 9.4 qui devraient être regroupés au sein d'une seule nouvelle espèce, qui reste à définir.

Les problèmes de reclassification des groupes de *X. axonopodis* en espèces concernent également le groupe 9.2. Actuellement, trois nouvelles espèces ont été validées au sein de ce groupe. Il s'agit de *X. euvesicatoria*, *X. perforans* (91), et *X. afalfae* (165). L'ensemble des informations issues des données AFLP et MLSA suggère que ces espèces seraient synonymes. L'ensemble des souches de différents pathovars regroupées au sein du sous-groupe 9.2 semble ne former qu'une seule et même espèce.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aabenhus, R., On, S. L. W., Siemer, B. L., Permin, H., and Andersen, L. P. 2005. Delineation of *Campylobacter concisus* genomospecies by amplified fragment length polymorphism analysis and correlation of results with clinical data. *J. Clin. Microbiol.* 43 (10):5091-5096.
2. Abdi, H. 2007. Metric multidimensional scaling (MDS): analyzing distance matrices. in: *Encyclopedia of measurement and statistics*, N. Salkind, ed. Sage, Thousand Oaks, CA.
3. Achtman, M. 2004. Population structure of pathogenic bacteria revisited. *International Journal of Medical Microbiology* 294 (2-3):67-73.
4. Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A., and Carniel, E. 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (24):14043-14048.
5. Adhikari, T. B., Shrestha, A., Basnyat, R. C., and Mew, T. W. 1999. Use of partial host resistance in the management of bacterial blight of rice. *Plant Dis.* 83 (10):896-901.
6. Afzal, M. A. 1987. Outbreaks and new records. Pakistan. Black spot of mango. *FAO Plant Prot. Bull.* 35 (4):165.
7. Ah-You, N., Gagnevin, L., Chiroleu, F., Jouen, E., Neto, J. R., and Pruvost, O. 2007. Pathological variations within *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* support its separation into three distinct pathovars that can be distinguished by AFLP. *Phytopathology* 97:000-000.
8. Ah-You, N. G., L.; Myint, N.T., ; Johnson, G. I. ; O. Pruvost. soumis. First report in Myanmar of *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica* L.. . *Plant Disease*.
9. Alfano, J. R., Charkowski, A. O., Deng, W.-L., Badel, J. L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K., and Collmer, A. 2000. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (9):4856-4861.
10. Ann, P. J. 1978. Studies on mango bacterial spot. I. Ecology and disease development. *Nat. Sci. Council Monthly* VI (7):1-21.

11. Anonymous. 2006. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 (5):925-927.
12. Anonymous. 2007. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (5):893-897.
13. Arlat, M., Gough, C. L., Barber, C. E., Boucher, C., and Daniels, M. J. 1991. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4 (6):593-601.
14. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1991. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New-York.
15. Barbosa, F. R., Haji, F. N. P., De Alencar, J. A., Moreira, A. N., De Tavares, S. C. C., Lima, M. F., and Moreira, W. A. 2000. Monitoramento de pragas e doenças na cultura da mangueira. Page 33 in: Embrapa Semi-Árido. Documentos Embrapa Semi-Árido, Petrolina, PE.
16. Bayles, M. B., and Johnson, W. M. 1985. Growth of homologous and heterologous phytopathogenic bacteria in cotton lines susceptible, resistant, or immune to blight. *Phytopathology* 75 (5):515-519.
17. Bompeix, G., and Coleno, A. 1984. Problèmes de terminologie des subdivisions intraspécifiques des plantes hôtes et des agents pathogènes. Pages 45-52 in: *Variation et variabilité des agents phytopathogènes*. 26ème Colloque SFP INRA Publ. Paris, France, Avignon, France.
18. Bonas, U., Huguet, E., Noel, L., Pierre, M., Rossier, O., Wengelnik, K., and Van den Ackerveken, G. 1996. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene regulation and avirulence gene *avrBs3* recognition. Pages 203-208 in: *Biology of Plant-Microbe Interactions*, G. Stacey, B. Mullin and P. M. Gresshoff, eds. International Soc Molecular Plant-Microbe Interactions, 3340 Pilot Knob Rd/St Paul/MN 55121-2097.
19. Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, B. J., and Stall, R. E. 1991. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4 (1):81-88.
20. Bonas, U., and Van den Ackerveken, G. 1996. Bacterial *hrp* and avirulence genes are key determinants in plant-pathogen interactions. Pages 59-72 in: *Aerial plant surface microbiology*, C. E. Morris, P. C. Nicot and C. Nguyen-The, eds. Plenum Press, New-York.

21. Bonas, U., Van den Ackerveken, G., Buttner, D., Hahn, K., Marois, E., Nennstiel, D., Noel, L., Rossier, O., and Szurek, B. 2000. How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* conquers the host. *Mol. Plant Pathol.* 1 (1):73-76.
22. Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W., and Top, E. M. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39 (2):101-112.
23. Boudon, S., Manceau, C., and Notteghem, J. L. 2005. Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western Europe. *Phytopathology* 95 (9):1081-1088.
24. Brehm, G., Homeier, J., and Fiedler, K. 2003. Beta diversity of geometrid moths (Lepidoptera : Geometridae) in an Andean montane rainforest. *Divers. Distrib.* 9 (5):351-366.
25. Brenner, D. J. 1978. Characterization and clinical identification of Enterobacteriaceae by DNA hybridization. *Prog Clin Pathol* 7:71-117.
26. Brenner, D. J., G. R. Fanning, A. V. Rake, and K. E. Johnson. 1969. Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Anal. Biochem.* 28:447-459.
27. Brenner, D. J., McWhorter, A. C., Leete-Knutson, J. K., and Steigerwalt, A. G. 1982. *Escherichia vulneris*: a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds. *J. Clin. Microbiol.* 15 (6):1133-1140.
28. Buruchara, R. A., Mukunya, D. M., and Gathuru, E. M. 1990. Bacterial black spot of mangoes in Kenya. Pages 577-582 in: 7th Int. Conf. Plant Path. Bact., Z. Klement, ed. Akademiai Kiado Budapest, Hungary, Budapest, Hungary.
29. Campbell, C. L., and Madden, L. V. 1990. Temporal analysis of epidemics. I: description and comparison of disease progress curves. Pages 161-202 in: *Introduction to plant disease epidemiology* John Wiley & Sons, New York.
30. Champoiseau, P., Daugrois, J. H., Girard, J. C., Royer, M., and Rott, P. C. 2006. Variation in albicidin biosynthesis genes and in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* 96 (1):33-45.
31. Chelo, I. M., Ze-Ze, L., and Tenreiro, R. 2007. Congruence of evolutionary relationships inside the Leuconostoc-Oenococcus-Weissella clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, dnaA, gyrB, rpoC and dnaK. *Int J Syst Evol Microbiol* 57 (Pt 2):276-286.

32. Chelo, I. M., Ze-Ze, L., and Tenreiro, R. 2007. Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *dnaA*, *gyrB*, *rpoC* and *dnaK*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2):276-286.
33. Coenye, T., Gevers, D., de Peer, Y. V., Vandamme, P., and Swings, J. 2005. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *Fems Microbiology Reviews* 29 (2):147-167.
34. Cohan, F. M. 2001. Bacterial species and speciation. *Syst Biol* 50 (4):513-524.
35. Cohan, F. M. 2002. What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.* 56:457-487.
36. Colwell, R. R. 1970. Polyphasic taxonomy of bacteria. Pages 421-436 in: *Culture collectio of Microorganisms*, T. H. H. Izuka, ed. University of Tokyo Press Tokyo.
37. Crosa, J. H., Brenner, D. J., and Falkow, S. 1973. Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. *J. Bacteriol.* 115 (3):904-911.
38. Cubero, J., and Graham, J. H. 2004. The leucine-responsive regulatory protein (*lrp*) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:429-437.
39. Cubero, J., and Graham, J. H. 2004. The leucine-responsive regulatory protein (*lrp*) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:429-437.
40. Da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M., Do Amaral, A. M., Bertolini, M. C., Camargo, L. E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L. P., Cicarelli, R. M., Coutinho, L. L., Cursino-Santos, J. R., El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J., Ferreira, R. C., Ferro, M. I., Formighieri, E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L. T., Leite, R. P., Lemos, E. G., Lemos, M. V., Locali, E. C., Machado, M. A., Madeira, A. M., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F., Miyaki, C. Y., Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R., Pereira, H. A., Rossi, A., Sena, J. A., Silva, C., De Souza, R. F., Spinola, L. A., Takita, M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I., Trindade dos Santos, M., Truffi, D., Tsai, S. M., White, F. F., Setubal, J. C., and Kitajima, J. P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459-463.
41. De Ley, J., Cattoir, H., and Reynaerts, A. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12:133-142.

42. De Vos, P. 1983. Intra- and intergenomic similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal nucleic acid cistrons. *International Journal of Systematic and Bacteriology* 33:487-509.
43. Destefano, S. A. I., Almeida, I. M. G., Malavolta Jr., V. A., Papa, M. F. S., Balani, D. M., and Ferreira, M. 2001. Caracterização molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* isolada de caju. *Summa Phytopathol.* 27 (1):117.
44. Dodd, J. C., Prusky, D., and Jeffries, P. 1997. Fruit diseases. Pages 257-291 in: *The mango : botany, production and uses*, R. E. Litz, ed. CAB International, Oxon, New-York.
45. Doidge, E. M. 1915. A bacterial disease of the mango. *Bacillus mangiferae* n. sp. *Ann. Appl. Biol.* II (1):1-44.
46. Donahoo, S., Norman, D. J., and Jones, J. B. 2003. Genetic variation within *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. *Phytopathology* 93 (6):S21.
47. Dowson, W. J. 1939. On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. *Zentralblatt für Bakteriologie* 177-193.
48. Dye, D. W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A., and Schroth, M. N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.* 59 (4):153-168.
49. Dye, D. W., and Lelliott, R. A. 1974. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187. Pages 243-249 in: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Williams & Wilkins, Baltimore.
50. Egel, D. S., Graham, J. H., and Riley, T. D. 1991. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* differing in aggressiveness on Swingle citrumelo and grapefruit. *Phytopathology* 81 (6):666-671.
51. El Goorani, M. A. 1987. Plant diseases caused by bacteria in United Arab Emirates. Pages 653-657 in: 6th Int. Conf. Plant Path. Bact., E. L. Civerolo, A. Collmer, R. E. Davis and A. G. Gillapsie, eds. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht Boston Lancaster, College Park, MD (USA).
52. Euzeby, J. 2007. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:893-897.
53. Facelli, E., Taylor, C., Scott, E., Emmett, R., Fegan, M., and Sedgley, M. 2002. Bacterial dieback of pistachio in Australia. *Australas. Plant Pathol.* 31 (1):95-96.

54. Facelli, E., Taylor, C., Scott, E., Fegan, M., Huys, G., Noble, R. D., Swings, J., and M., S. 2005. Identification of the causal agent of pistachio dieback in Australia. *Eur. J. Plant Pathol.* 112 (2):155-165.
55. Fargier, E. 2007. 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. PhD. Université d'Angers.
56. Fett, W. F., Gerard, H. C., R.A., M., Osman, S. F., and Jones, L. E. 1992. Screening on nonfilamentous bacteria for production of cutin-degrading enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (7):2123-2130.
57. Flor, H. H. 1955. Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology* 45:680-685.
58. Fukuda, T., Uehara, K., Azegami, K., Tabei, H., and Nishiyama, K. 1990. Bacterial canker of Mango in Japan caused by *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 56 (4):474-480.
59. Gabriel, D. W., Kingsley, M. T., Hunter, J. E., and Gottwald, T. 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 (1):14-22.
60. Gagnevin, L. 1998. Analyse de la diversité génétique de *Xanthomonas* pv. *mangiferaeindicae* et sa signification dans le pouvoir pathogène et la biologie de la bactérie. Implications dans l'épidémiologie de la maladie des taches noires du manguier à l'île de la Réunion. PhD. INA P-G, Paris, France.
61. Gagnevin, L., Leach, J. E., and Pruvost, O. 1997. Genomic variability of the *Xanthomonas* pathovar *mangiferaeindicae*, agent of mango bacterial black spot. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1):246-253.
62. Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2001. Epidemiology and control of mango bacterial black spot. *Plant Dis.* 85 (9):928-935.
63. Gascuel, O. 1997. Concerning the NJ algorithm and its unweighted version UNJ. Pages 149-171 in: *Mathematical hierarchies and biology*, B. Mirkin, F. R. McMorris, F. Roberts and A. Rzhetsky, eds. American Mathematical society, Providence, RI, USA.
64. Gassmann, W., Dahlbeck, D., Chesnokova, O., Minsavage, G. V., Jones, J. B., and Staskawicz, B. J. 2000. Molecular evolution of virulence in natural field strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 182 (24):7053-7059.

65. Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F. L., and Swings, J. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3 (9):733-739.
66. Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F. L., and Swings, J. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Rev. Microbiol.* 3 (9):733-739.
67. Godoy, D., Randle, G., Simpson, A. J., Aanensen, D. M., Pitt, T. L., Kinoshita, R., and Spratt, B. G. 2003. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J Clin Microbiol* 41 (5):2068-2079.
68. Goncalves, E. R., and Rosato, Y. B. 2002. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:355-361.
69. Grimont, P. A. D. 1988. Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can. J. Microbiol.* 34:541-546.
70. Grimont, P. A. D., Popoff, M. Y., Grimont, F., Coynault, C., and Lemelin, M. 1980. Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr. Microbiol.* 4:325-330.
71. Groth, D. E., and Braun, E. J. 1986. Growth kinetics and histopathology of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in leaves of resistant and susceptible soybeans. *Phytopathology* 76:959-965.
72. Guindon, S., and Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52 (5):696-704.
73. Gupta, R. S. 1998. Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among Archaeobacteria, Eubacteria and Eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (4):1435-1491.
74. Gupta, R. S. 2000. The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Critic. Rev. Microbiol.* 26 (2):111-131.
75. Hanage, W. P., Fraser, C., and Spratt, B. G. 2005. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol.* 3 (6).
76. Hanage, W. P., Fraser, C., and Spratt, B. G. 2006. Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361 (1475):1917-1927.

77. Hanage, W. P., Kaijalainen, T., Herva, E., Saukkoriipi, A., Syrjanen, R., and Spratt, B. G. 2005. Using multilocus sequence data to define the *Pneumococcus*. *J. Bacteriol.* 187 (17):6223-6230.
78. Hauben, L., Vauterin, L., Moore, E. R. B., Hoste, B., and Swings, J. 1999. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1749-1760.
79. Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J., and Moore, E. R. B. 1997. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (2):328-335.
80. He, S. Y. 1996. Elicitation of plant hypersensitive response by bacteria. *Plant Physiol.* 112 (3):865-869.
81. He, S. Y., Bauer, D. W., Collmer, A., and Beer, S. V. 1994. Hypersensitive response elicited by *Erwinia amylovora* harpin requires active plant metabolism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7 (2):289-292.
82. Hong, Y., Garcia, M., Levisohn, S., Lysnyansky, I., Leiting, V., Savelkoul, P. H. M., and Kleven, S. H. 2005. Evaluation of amplified fragment length polymorphism for differentiation of avian *Mycoplasma* species. *J. Clin. Microbiol.* 43 (2):909-912.
83. Hopkins, C. M., White, F. F., Choi, S. H., Guo, A., and Leach, J. E. 1992. Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5 (6):451-459.
84. Huelsenbeck, J. P., and Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17 (8):754-755.
85. Humeau, L., Roumagnac, P., Picard, Y., Robène-Soustrade, I., Chiroleu, F., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2006. Quantitative and molecular epidemiology of bacterial blight of onion in seed production fields. *Phytopathology* 96 (12):1345-1354.
86. Huys, G., Janssen, P., and Kersters, K. 1997. Is AFLP fingerprinting a true alternative to the DNA-DNA pairing method to assess genospecies in the genus *Aeromonas*? - Reply. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1):245-246.
87. Huys, G., Rigouts, L., Chemlal, K., Portaels, F., and Swings, J. 2000. Evaluation of amplified fragment length polymorphism analysis for inter- and intraspecific differentiation of *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, and *M. ulcerans*. *J. Clin. Microbiol.* 38 (10):3675-3680.
88. Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., and Kersters, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology - UK* 142:1881-1893.

89. Johnson, J. L. 1984. Nucleic acids in bacterial classification. Pages 8-11 in: Bergey's manual of systematic bacteriology, N. R. Krieg and J. G. Holt, eds. Williams & Wilkins, Baltimore London.
90. Johnson, J. L. 1984. Nucleic acids in bacterial classification. Pages 8-11 in: Bergey's manual of systematic bacteriology, J. G. H. N. R. Krieg ed. Williams, Wilkins, Baltimore London.
91. Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., and Schaad, N. W. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* 27 (6):755-762.
92. Kearney, B., and Staskawicz, B. J. 1990. Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature* 346:385-386.
93. Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., and Achtman, M. 2002. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect. Genet. Evol.* 2:39-45.
94. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16 (2):111-120.
95. Kotetishvili, M., Kreger, A., Wauters, G., Morris, J. G., Jr., Sulakvelidze, A., and Stine, O. C. 2005. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* 43 (6):2674-2684.
96. Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinf.* 5 (2):150-163.
97. Lan, R., and Reeves, P. R. 2001. When does a clone deserve a name ? A perspective on bacterial species based on population genetics. *Trends Microbiol.* 9 (9):419-424.
98. Lapage, S. P., Sneath, P. H. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seelinger, H. P. R., and Clark, W. A. 1975 (1976 revision) International Code of Nomenclature of Bacteria. Page 180 in: American Society for Microbiology, Washington DC.
99. Lapage, S. P., Sneath, P. H. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seelinger, H. P. R., and Clark, W. A. 1992. International Code of Nomenclature of Bacteria in: American Society for Microbiology, S. P. H. A. (1990), ed., Washington DC.
100. Leal-Klevezas, D. S., Martinez-de-la-Vega, O., Ramirez-Barba, E. J., Osterman, B., Martinez-Soriano, J. P., and Simpson, J. 2005. Genotyping of *Ochrobactrum* spp. by AFLP Analysis. *J. Bacteriol.* 187 (7):2537-2539.

101. Lee, B. M., Park, Y. J., Park, D. S., Kang, H. W., Kim, J. G., Song, E. S., Park, I. C., Yoon, U. H., Hahn, J. H., Koo, B. S., Lee, G. B., Kim, H., Park, H. S., Yoon, K. O., Kim, J. H., Jung, C. H., Koh, N. H., Seo, J. S., and Go, S. J. 2005. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Res* 33 (2):577-586.
102. Lim, T. K., Sijam, K., and Ong, E. T. 1991. Bacterial black spot of Mango. A new disease in Malaysia. *Acta Hort.* 291:317-323.
103. Lindstedt, B. A. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26 (13):2567-2582.
104. Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russel, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., and Spratt, B. G. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3140-3145.
105. Manicom, B. Q., and Wallis, F. M. 1984. Further characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34 (1):77-79.
106. Marmur, J., and Doty, P. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* 5:109-118.
107. Marois, E., Van den Ackerveken, G., and Bonas, U. 2002. The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15 (7):637-646.
108. Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., and Willems, A. 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 57 (Pt 3):489-503.
109. Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., and Willems, A. 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:489-503.
110. Martin, D. P., Williamson, C., and Posada, D. 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21 (2):260-262.
111. Mazzola, M., White, F. F., and Leach, J. E. 1992. Identification and partial characterization of a *hrp* gene cluster from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Phytopathology* 82 (10):1125.

112. Michel, V. V. 2001. Interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *graminis* strains and meadow fescue and Italian rye grass cultivars. *Plant Dis.* 85 (5):538-542.
113. Moffett, M. L., Peterson, R. A., and Wood, B. A. 1979. Bacterial black spot of mango. *Australas. Plant Pathol.* 8:54-56.
114. Moore, E. R. B., Kruger, A. S., Hauben, L., Seal, S. E., De Baere, R., De Wachter, R., Timmis, K. N., and Swings, J. 1997. 16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intrageneric relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol. Letters* 151 (2):145-153.
115. Morton, J. F. 1987. Cashew apple. Pages 239-240 in: *Fruits of warm climates*, J. F. Morton, ed. Creative Resource Systems, Inc., Winterville, NC, USA.
116. Mougel, C., Thioulouse, J., Perrière, G., and Nesme, X. 2002. A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:573-586.
117. Mukherjee, S. K. 1997. Introduction: botany and importance. Pages 1-21 in: *The mango: botany, production and uses*, R. E. Litz, ed. CAB International, Oxon, New-York.
118. Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., and Swings, J. 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology-(UK)* 151:2141-2150.
119. Nei, M., and Gojobori, T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3:418-426.
120. Nesme, X., Vaneechoutte, M., Orso, S., Hoste, B., and Swings, J. 1995. Diversity and genetic relatedness within genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rRNA gene. *System. Appl. Microbiol.* 18 (1):127-135.
121. On, S. L. W., Harrington, C. S., and Atabay, H. I. 2003. Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. *J. Appl. Microbiol.* 95 (5):1096-1105.
122. Palleroni, N. J., and Bradbury, J. F. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (3):606-609.

123. Papa, M. F. S., Matos, E. C., Almeida, I. M. G., Malavolta Jr., V. A., and Boliani, A. C. 2001. Ocorrência da mancha angular (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*) em cajueiro no estado do Mato Grosso do Sul. *Summa Phytopathol.* 27 (1):117.
124. Paradis, E. 2006. Analysis of phylogenetics and evolution with R. Springer, New York, NY (USA).
125. Patel, M. K., Kulkarni, Y. S., and Moniz, L. 1948. *Pseudomonas mangiferae-indicae*, pathogenic on mango. *Indian Phytopath.* 1:147-152.
126. Patel, M. K., Moniz, L., and Kulkarni, Y. S. 1948. A new bacterial disease of *Mangifera indica* L. *Current Sci.* 6:189-190.
127. Perrier, X., Flori, A., and Bonnot, F. 2003. Data analysis methods. Pages 43-76 in: Genetic diversity of cultivated tropical plants, P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier and J. C. Glaszmann, eds. Science, Enfield, NH USA.
128. Ploetz, R. C., and Prakash, O. 1997. Foliar, floral and soilborne diseases. Pages 281-327 in: The mango : botany, production and uses, R. E. Litz, ed. CAB International, Oxon, New-York.
129. Popoff, M., and Coynault, C. 1980. Use of DEAE-cellulose filters in the S1 nuclease method for bacterial deoxyribonucleic acid hybridization. *Ann Microbiol (Paris)* 131A (2):151-155.
130. Portier, P., Fischer-Le Saux, M., Mougel, C., Lerondelle, C., Chapulliot, D., Thioulouse, J., and Nesme, X. 2006. Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (11):7123-7131.
131. Portier, P., Fischer-Le Saux, M., Mougel, C., Lerondelle, C., Chapulliot, D., Thioulouse, J., and Nesme, X. 2006. Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (11):7123-7131.
132. Prakash, O., and Misra, A. K. 1992. Important diseases of mango and their effect on production. *Biol. Memoirs* 18 (1/2):39-55.
133. Pruvost, O. 1989. La maladie des taches noires de la mangue (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*). Etude bactériologique, biologique, épidémiologique et mise au point des bases d'un système de lutte intégrée dans les conditions de l'île de la Réunion. Thèse de doctorat. Université de Paris Sud - Orsay, Paris, France.
134. Pruvost, O., Couteau, A., and Luisetti, J. 1990. A new host plant of bacterial black spot of mangoes : Pepper tree (*Schinus terebenthifolius* Raddi). Pages 553-557 in: 7th Int. Conf. Plant Path. Bact., Klement, ed. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.

135. Pruvost, O., Couteau, A., and Luisetti, J. 1992. Pepper tree (*Schinus terebenthifolius* Radii), a new host plant for *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. J. Phytopathol. 135 (4):289-298.
136. Pruvost, O., Couteau, A., Luisetti, J., and Vernière, C. 1995. Biologie et épidémiologie de l'agent de la maladie des taches noires de la mangue. Fruits 50 (3):183-189.
137. Pruvost, O., Couteau, A., Perrier, X., and Luisetti, J. 1998. Phenotypic diversity of *Xanthomonas* sp. *mangiferaeindicae*. J. Appl. Microbiol. 84 (1):15-24.
138. Pruvost, O., Couteau, A., Vernière, C., and Luisetti, J. 1993. Epiphytic survival of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* on mango buds. Acta Hort. 341:337-344.
139. Pruvost, O., Gagnevin, L., Gloriès, V., Couteau, A., Mété, K., and Flahaut, B. 2001. Epidemiology and population structure of *Xanthomonas* pv. *mangiferaeindicae* present on partially resistant and susceptible mango cultivars. Page 11 in: 39th South African Society for Plant Pathology Congress, Greenway Woods, South Africa.
140. Pruvost, O., Gagnevin, L., Glories, V., Couteau, A., Some, A., and Samson, R. 2000. Phenotypic and genetic diversity of xanthomonads associated with Anacardiaceae. Acta Hort. 509:793-801.
141. Pruvost, O., Roumagnac, P., Gaube, C., Chiroleu, F., and Gagnevin, L. 2005. New media for the semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot. J. Appl. Microbiol. 99 (4):803-815.
142. Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., and De Bruijn, F. J. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:665-677.
143. Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., and De Bruijn, F. J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. Phytopathology 95 (9):1098-1111.
144. Restrepo, S., Duque, M., Tohme, J., and Verdier, V. 1999. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Microbiology - UK 145:107-114.
145. Restrepo, S., Duque, M. C., and Verdier, V. 2000. Characterization of pathotypes among isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. Plant Pathol. 49 (6):680-687.

146. Restrepo, S., Valle, T. L., Duque, M. C., and Verdier, V. 1999. Assessing genetic variability among Brazilian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* through restriction fragment length polymorphism and amplified fragment length polymorphism analyses. *Can. J. Microbiol.* 45 (9):754-763.
147. Restrepo, S., Velez, C. M., and Verdier, V. 2000. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. *Phytopathology* 90 (7):683-690.
148. Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F. R., and Baranton, G. 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:873-881.
149. Ridé, M., and Ridé, S. 1992. *Xanthomonas populi* (ex Ridé 1958) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42 (4):652-653.
150. Robbs, C. F. 1954. Bacterias fitopatogénicas do Brasil. *Agronomia* 13:265-282.
151. Robbs, C. F. 1973. Studies on the white xanthomonads in Brazil. Page 1056 in: 2nd Int. Cong. Plant Pathol., Minneapolis, MN (USA).
152. Robbs, C. F., Ribeiro, R. D. L. D., and Kimura, O. 1974. Sobre a posicao taxonomica de *Pseudomonas mangiferaeindicae* Patel et al. 1948, agente causal da "mancha bacteriana" das folhas da mangueira (*Mangifera indica* L.). *Arq. Univ. Fed. Rur., Rio de Janeiro* 4 (1):11-14.
153. Rossello-Mora, R., and Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (1):39-67.
154. Rott, P., Chatenet, M., Granier, M., and Baudin, P. 1988. L'échaudure des feuilles de canne à sucre provoquée par *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. II - Diagnostic et spectre d'hotes de l'agent pathogène en Afrique tropicale. *Agron. Trop.* 43 (3):244-251.
155. Rott, P., and Frossard, P. 1986. Un chancre bactérien du Prunier de Cythère (*Spondias cytherea*, Sonn.) en Martinique. *Fruits* 41 (10):605-613.
156. Rott, P. C., Costet, L., Davis, M. J., Frutos, R., and Gabriel, D. W. 1996. At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *J. Bacteriol.* 178 (15):4590-4596.
157. Roumagnac, P. 2003. Taxonomie et diversité du *Xanthomonas* responsable du dépérissement bactérien de l'oignon. Etudes épidémiologiques du rôle des semences dans la transmission de la bactérie. PhD. INA P-G, Paris, France.

158. Roumagnac, P., Gagnevin, L., Gardan, L., Sutra, L., Manceau, C., Dickstein, E. R., Jones, J. B., Rott, P., and Pruvost, O. 2004. Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (1):15-24.
159. Rozas, J., Sanchez-Del Barrio, J. C., Messeguer, X., and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19 (18):2496-2497.
160. Rudolph, K. 1993. Infection of the plant by *Xanthomonas*. Pages 193-264 in: *Xanthomonas*, J. G. Swings and E. L. Civerolo, eds. Chapman & Hall, London.
161. Saddler, G. S., and Bradbury, J. F. 2005. Family I. Xanthomonadaceae fam. nov. . Pages 63-90 in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley, eds. Springer, New York.
162. Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4):406-425.
163. Santos Filho, H. P., De Holanda Tavares, S. C. C., De Matos, A. P., De Oliveira Costa, V. S., Moreira, W. A., and Ferreira dos Santos, C. C. 2002. Doenças, monitoramento e controle. Pages 299-352 in: *A cultura de mangueira*, P. J. De Carvalho Genu and A. C. De Queros Pinto, eds. Embrapa, Brasilia, DF, Brazil.
164. Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst Appl Microbiol* 29 (8):690-695.
165. Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. 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. *malvoearum* (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. *Syst. Appl. Microbiol.* 28 (6):494-518.

166. Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* 29 (8):690-695.
167. Shekhawat, G. S., and Patel, P. N. 1975. Studies on bacterial canker of mango. *Pfl. Krankh.* 3:129-138.
168. Shimodaira, M., and Hasegawa, M. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 16:1114-1116.
169. Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanova, J., Stadler, N., and Hofer, M. 1999. Oxidative stress in microorganisms - I - Microbial vs. higher cells - Damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiol. Prague* 44 (6):587-624.
170. Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A. 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:22-420.
171. Somé, A., and Samson, R. 1996. Isoenzyme diversity in *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. *Plant Pathol.* 45 (3):426-431.
172. Stackebrandt, E. 2002. From species definition to species concept: population genetics is going to influence the systematics of prokaryotes. *WFCC Newsletter* 35:1-4.
173. Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kampf, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C., and Whitman, W. B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1043-1047.
174. Staley, J. T. 2006. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361 (1475):1899-1909.
175. Starr, M. P. 1981. The genus *Xanthomonas*. Pages 742-763 in: *The prokaryotes : a handbook of habitats, isolation and identification of bacteria*, Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schlegel, eds. Springer -Verlag, Berlin Heidelberg New York.
176. Swings, J., Van Den Mooter, M., Vauterin, L., Hoste, B., Gillis, M., Mew, T. W., and Kersters, K. 1990. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (3):309-311.
177. Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.

178. Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C. B., and Swings, J. 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9):5107-5115.
179. Thompson, F. L., Li, Y., Gomez-Gil, B., Thompson, C. C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G. S., Pereira, A., De Bem, M. M., Sorgeloos, P., and Swings, J. 2003. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (Bivalves, fish, rotifers and shrimps). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:245-252.
180. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. 1997. The clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25 (24):4876-4882.
181. Trébaol, G., Gardan, L., Manceau, C., Tanguy, J. L., Tirilly, Y., and Boury, S. 2000. Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae* : a new species causing bacterial bract spot of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1471-1478.
182. Trebaol, G., Manceau, C., Tirilly, Y., and Boury, S. 2001. Assessment of the genetic diversity among strains of *Xanthomonas cynarae* by randomly amplified polymorphic DNA analysis and development of specific characterized amplified regions for the rapid identification of *X. cynarae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (8):3379-3384.
183. Van den Mooter, M., and Swings, J. 1990. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (4):348-369.
184. Van Doorn, J., Boonekamp, P. M., and Oudega, B. 1994. Partial characterization of fimbriae of *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7 (3):334-344.
185. Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Menck, C. F. M., Da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Oliveira, M. C., Setubal, J. C., Kitajima, J. P., and Simpson, A. J. 2002. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:169-189.
186. Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60 (2):407-438.

187. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (3):472-489.
188. Vauterin, L., Hoste, B., Yang, P., Alvarez, A., Kersters, K., and Swings, J. 1993. Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Pages 157-192 in: *Xanthomonas*, J. G. Swings and E. L. Civerolo, eds. Chapman & Hall, London.
189. Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* 90 (7):677-682.
190. Vauterin, L., and Swings, J. 1997. Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas* ? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19 (2):77-82.
191. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vandelee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 (21):4407-4414.
192. Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichewsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackenbrandt, E., Starr, M. P., and Truper, H. G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation on approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37 (4):463-464.
193. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51 (2):221-271.
194. Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4576-4579.
195. Young, J. M., Bradbury, J. F., Gardan, L., Gvozdyak, R. I., Stead, D. E., Takikawa, Y., and Vidaver, A. K. 1991. Comment on the reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse 1915) Gabriel et al. 1989 and *X. phaseoli* (ex Smith 1897) Gabriel et al. 1989 : indication of the needs for minimal standards for the genus *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (1):172-177.
196. Young, J. M., Bull, C. T., De Boer, S. H., Firrao, G., Gardan, L., Saddler, G. E., Stead, D. E., and Takikawa, Y. 2001. Classification, nomenclature, and plant pathogenic bacteria - A clarification. *Phytopathology* 91 (7):617-620.
197. Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C.G., Robbs, C. F., . 1978. The use of the term "pathovar" in the classification of plant pathogenic bacteria. *N Z J Agric Res* 21:153-177.
198. Young, J. M., Takikawa, Y., Gardan, L., and Stead, D. E. 1992. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:67-105.

Annexes

Tableau 5 : annexe, souches de *Xanthomonas* utilisées pour l'étude AFLP du pathovar *mangiferaeindicae* (chapitre II)

Strain ¹	Geographic origin	Host	AFLP haplotype/ <i>X. axonopodis</i> group ²	Pathovar ³	RFLP group ⁴
CFBP 2921	Australia	<i>Mangifera indica</i>	6/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C3
CFBP 2922	Australia	<i>Mangifera indica</i>	7/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND ⁵
CFBP 2935	Australia	<i>Mangifera indica</i>	14/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C3
NCPPB 3124	Australia	<i>Mangifera indica</i>	19/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C3
JF28-11	Australia	<i>Mangifera indica</i>	35/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C3
JF28-10	Australia	<i>Mangifera indica</i>	36/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C3
JF28-6	Australia	<i>Mangifera indica</i>	37/.95	<i>mangiferaeindicae</i>	C3
JF28-7	Australia	<i>Mangifera indica</i>	38/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C3
JF28-8	Australia	<i>Mangifera indica</i>	39/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C3
JF28-9	Australia	<i>Mangifera indica</i>	40/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C3
CFBP 2931	Comoros	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JF955	Comoros	<i>Mangifera indica</i>	46/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
LA86-1	Comoros	<i>Mangifera indica</i>	124/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
LA86-2	Comoros	<i>Mangifera indica</i>	125/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
CFBP 1716 ⁶	India	<i>Mangifera indica</i>	1/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C2
CFBP 2916	India	<i>Mangifera indica</i>	4/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
CFBP 2917	India	<i>Mangifera indica</i>	5/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C2
NCPPB 3596	India	<i>Mangifera indica</i>	20/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JJ238-46	India	<i>Mangifera indica</i>	50/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C3
JP682	India	<i>Mangifera indica</i>	60/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JP683	India	<i>Mangifera indica</i>	61/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JQ611-1	India	<i>Mangifera indica</i>	68/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ611-2	India	<i>Mangifera indica</i>	68/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ611-3	India	<i>Mangifera indica</i>	68/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ611-4	India	<i>Mangifera indica</i>	68/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ611-5	India	<i>Mangifera indica</i>	69/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JN570	Japan	<i>Mangifera indica</i>	54/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN571	Japan	<i>Mangifera indica</i>	55/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN572	Japan	<i>Mangifera indica</i>	55/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN578	Japan	<i>Mangifera indica</i>	55/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN573	Japan	<i>Mangifera indica</i>	56/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN581	Japan	<i>Mangifera indica</i>	56/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN574	Japan	<i>Mangifera indica</i>	57/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN576	Japan	<i>Mangifera indica</i>	57/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN577	Japan	<i>Mangifera indica</i>	57/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN582	Japan	<i>Mangifera indica</i>	57/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN583	Japan	<i>Mangifera indica</i>	57/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN575	Japan	<i>Mangifera indica</i>	58/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JN579	Japan	<i>Mangifera indica</i>	59/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
CFBP 2930	Mauritius	<i>Mangifera indica</i>	11/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
CFBP 2936	Mauritius	<i>Mangifera indica</i>	15/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JG98-1	Mauritius	<i>Mangifera indica</i>	15/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JG98-2	Mauritius	<i>Mangifera indica</i>	15/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JF29-2	Mauritius	<i>Mangifera indica</i>	25/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
JF29-5	Mauritius	<i>Mangifera indica</i>	41/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JG98-3	Mauritius	<i>Mangifera indica</i>	47/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JJ234-1	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JM22-1	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A

Strain ¹	Geographic origin	Host	AFLP haplotype/ <i>X. axonopodis</i> group ²	Pathovar ³	RFLP group ⁴
JM22-2	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JM22-3	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JM22-4	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JM23-1	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JM23-2	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JM24-3	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JM24-4	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JJ234-6	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	15/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JJ234-4	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	45/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JJ234-3	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	48/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JJ234-5	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	49/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JM24-1	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	53/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JM24-2	New Caledonia	<i>Mangifera indica</i>	53/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JK147-1	Philippines	<i>Mangifera indica</i>	51/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JK147-2	Philippines	<i>Mangifera indica</i>	51/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
CFBP 1717	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	2/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
A8	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JP501-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JP501-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JP501-3	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JP501-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JP501-6	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JR510-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR556-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR560-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
CFBP 2927	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	8/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
CFBP 2928	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	9/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JP517	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	11/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
CFBP 2932	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JR555-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR559-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS590-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
CFBP 2933	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	13/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
JR738	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	13/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV802-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	13/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV802-14	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	13/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV802-18	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	13/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV802-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	13/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV802-9	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	13/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
CFBP 2938	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	16/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
CFBP 2939	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	17/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
CFBP 2940	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	18/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JR536-1	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	18/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR536-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	19/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
G2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	21/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
A11-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	22/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
A11-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	23/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
A13	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	24/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
A17	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	25/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
B16	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	25/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
A23	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	26/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
A24-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	27/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1

Strain ¹	Geographic origin	Host	AFLP haplotype/ <i>X. axonopodis</i> group ²	Pathovar ³	RFLP group ⁴
A26-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	28/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
A30	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	29/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
A36	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	30/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
A5-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	31/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
A5-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	32/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
A6-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	33/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
A6-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	33/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
B17	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	34/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
G21-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	35/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JF30-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	42/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JF30-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	43/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JF30-3	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	43/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JF30-6	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	43/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JF30-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	44/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JF30-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	44/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR729	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	45/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS566-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	45/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR539-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	49/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR561-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	49/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR557-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	53/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR560-3	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	53/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JP709	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	62/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	C1
JP737	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	63/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JP739	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JP740	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JP741	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JP743	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JP757	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JP759	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JP760	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JQ776-4	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ776-7	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ776-8	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR504-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR602-6	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV803-10	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV803-20	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JP758	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	66/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JQ776-10	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	66/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ776-1	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	70/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ776-11	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	71/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR530-1	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	71/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR530-2	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	71/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ776-12	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	72/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ776-5	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	72/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ776-9	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	72/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR536-7	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	72/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR600-6	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	72/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ776-2	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	73/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ776-3	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	73/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JQ776-6	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	74/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR533-1	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	75/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND

Strain ¹	Geographic origin	Host	AFLP haplotype/ <i>X. axonopodis</i> group ²	Pathovar ³	RFLP group ⁴
JR537-6	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	76/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR538-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	77/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR539	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	78/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR539-3	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	79/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR540-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	80/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS921-1	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	80/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR552-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	81/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV803-1	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	81/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR552-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	82/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR553-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	83/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR553-18	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	84/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR553-19	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	85/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR554-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	86/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR556-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	87/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR560-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	88/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR600-3	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	89/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR601-7	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	90/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR602-1	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	90/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR602-7	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	91/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR605-1	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	92/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR606-1	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	93/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR606-2	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	94/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR727	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	95/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR728	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR734	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS571-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS571-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS578-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS578-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS590-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS603-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS610-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS614-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS614-3	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS614-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS614-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS615-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS617-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS645-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS646-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS646-3	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS646-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS646-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS651-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS654-3	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS660-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS660-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS685-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS693-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS693-3	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS697-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS704-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND

Strain ¹	Geographic origin	Host	AFLP haplotype/ <i>X. axonopodis</i> group ²	Pathovar ³	RFLP group ⁴
JS874-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS885-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS921-2	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS921-3	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS921-4	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS922-1	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS922-3	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS922-4	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR730	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	97/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR731	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	98/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR732	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	99/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR733	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	100/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR735	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	100/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR736	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	101/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS626-3	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	101/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR737	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	102/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS658-3	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	102/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR739	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	103/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR740	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	104/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR741	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	105/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR742	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	106/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR746	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	107/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JR749	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	108/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS565-1	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	109/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS569-3	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	110/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS626-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	110/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS570-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	111/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS572-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	112/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS590-2	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	113/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS590-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	113/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS610-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	114/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS639-5	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	114/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JS693-4	Reunion Island	<i>Mangifera indica</i>	115/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV803-15	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	122/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV803-5	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	122/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV803-25	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	123/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JP738	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	64/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JP742	Reunion Island	<i>Schinus terebinthifolius</i>	65/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	D
JP782-1	Rodrigues Island	<i>Mangifera indica</i>	67/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JP782-2	Rodrigues Island	<i>Mangifera indica</i>	67/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
CFBP 2915	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
CFBP 2926	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JG728	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JG730	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	3/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
CFBP 2934	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JF952	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JG732	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JV1106-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1107	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1108	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1110	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1111	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND

Strain ¹	Geographic origin	Host	AFLP haplotype/ <i>X. axonopodis</i> group ²	Pathovar ³	RFLP group ⁴
JV1114	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1115	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1116	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1117	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1119-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1120-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1121	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1122-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1123-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1124-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1125-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1126	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1127	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1128	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1129	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1130-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1131	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1133	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1133-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1134	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1135-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1136	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1137	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1138	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1139-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1140	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1141-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1142-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1143-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1144-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1145-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1146	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1147-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1149-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1150-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	12/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JG725	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	15/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JG726	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	15/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JG729	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	34/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JF950	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	45/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JF951	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	45/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JF953	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	45/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JG727	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	45/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JK119-2	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	45/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	A
JV1102	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	45/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1085-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1086-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1087-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1089-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1090-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1092-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1098-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1099-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND

Strain ¹	Geographic origin	Host	AFLP haplotype/ <i>X. axonopodis</i> group ²	Pathovar ³	RFLP group ⁴
JV1101	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1104	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1105-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	96/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1088-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	116/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1091-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	116/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1093	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	117/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1094-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	117/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1096	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	117/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1097	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	117/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1103-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	117/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1109	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	118/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1112	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	119/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1148-1	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	119/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1113	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	120/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
JV1118	South Africa	<i>Mangifera indica</i>	121/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	ND
CFBP 2929	Taiwan	<i>Mangifera indica</i>	10/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
JM20	Thailand	<i>Mangifera indica</i>	52/9.5	<i>mangiferaeindicae</i>	B
CFBP 2547 ⁵	Fr. West Indies	<i>Spondias dulcis</i>	NA ⁸ /9.4	<i>spondiae</i>	NA
CFBP 2623	Fr. West Indies	<i>Spondias dulcis</i>	NA/9.4	<i>spondiae</i>	NA
CFBP 2912	Brazil	<i>Mangifera indica</i>	NA/9.6	<i>anacardii</i>	NA
CFBP 2913 ⁵	Brazil	<i>Mangifera indica</i>	NA/9.6	<i>anacardii</i>	NA
CFBP 2914	Brazil	<i>Mangifera indica</i>	NA/9.6	<i>anacardii</i>	NA
LA98	Brazil	<i>Anacardium occidentale</i>	NA/9.6	<i>anacardii</i>	NA
LA99	Brazil	<i>Anacardium occidentale</i>	NA/9.6	<i>anacardii</i>	NA
LA100	Brazil	<i>Anacardium occidentale</i>	NA/9.6	<i>anacardii</i>	NA
LA101	Brazil	<i>Anacardium occidentale</i>	NA/9.6	<i>anacardii</i>	NA
LA102	Brazil	<i>Anacardium occidentale</i>	NA/9.6	<i>anacardii</i>	NA
LA103	Brazil	<i>Anacardium occidentale</i>	NA/9.6	<i>anacardii</i>	NA
CFBP 2923	Brazil	<i>Mangifera indica</i> (yellow)	NA	unknown	NA
CFBP 2924	Brazil	<i>Mangifera indica</i> (yellow)	NA	unknown	NA
LMG 7303 ⁶	New Zealand	<i>Begonia tuberhybrida</i>	NA/9.1	<i>begoniae</i>	NA
LMG 551	United Kingdom	<i>Begonia tuberhybrida</i>	NA/9.1	<i>begoniae</i>	NA
CFBP 6369 ⁶	Réunion Island	<i>Allium cepa</i>	NA/9.2	<i>allii</i>	NA
LMG 811 ⁶	India	<i>Crotalaria juncea</i>	NA/9.2	<i>patelii</i>	NA
LMG 982 ^{6,7}	Colombia	<i>Axonopus scoparius</i>	NA/9.3	<i>axonopodis</i>	NA
LMG 899	Mauritius	<i>Thysanolaena maxima</i>	NA/9.3	<i>vasculorum</i>	NA
LMG 7455 ⁶	United States	<i>Phaseolus vulgaris</i>	NA/9.4	<i>phaseoli</i>	NA
CFBP 2603 ⁶	Colombia	<i>Manihot esculenta</i>	NA/9.4	<i>manihotis</i>	NA
LMG 695 ⁶	Brazil	<i>Anthurium</i> sp.	NA/9.4	<i>dieffenbachiae</i>	NA
CFBP 2525 ⁶	New Zealand	<i>Citrus limon</i>	NA/9.5	<i>citri</i>	NA
LMG 712 ⁶	Sudan	<i>Glycine max</i>	NA/9.5	<i>glycines</i>	NA
LMG 558 ⁶	India	<i>Cajanus cajan</i>	NA/9.5	<i>cajani</i>	NA
LMG 9045 ⁶	India	<i>Clitoria biflora</i>	NA/9.5	<i>clitoriae</i>	NA
LMG 937	?	?	NA/9.5	<i>vitians</i>	NA
LMG 761 ⁶	Sudan	<i>Gossypium</i> sp.	NA/9.5	<i>malvacearum</i>	NA
CFBP 2866	Brazil	<i>Citrus aurantiifolia</i>	NA/9.6	<i>aurantifolii</i>	NA
LMG 828	Sudan	<i>Vigna unguiculata</i>	NA/9.6	<i>vignicola</i>	NA
LMG 867 ⁶	?	<i>Sesbania sesban</i>	NA/9.6	<i>sesbaniae</i>	NA
LMG 8021 ⁶	Sudan	<i>Rhynchosia memnonia</i>	NA/9.6	<i>rhynchosiae</i>	NA
LMG 936 ⁶	Sudan	<i>Vigna radiata</i>	NA/9.6	<i>vignaeradiatae</i>	NA

Strain ¹	Geographic origin	Host	AFLP haplotype/ <i>X. axonopodis</i> group ²	Pathovar ³	RFLP group ⁴
LMG 7511	United States	<i>Phaseolus</i> sp.	NA/9.6	<i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	NA
LMG 568 ^{6,7}	United Kingdom	<i>Brassica oleracea</i>	NA	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	NA

¹ CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (INRA Angers, France); LMG: Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms (University of Ghent, Belgium); NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (CSL, York, United Kingdom). Other strains are available in our laboratory collection.

² AFLP groups as described by Rademaker et al. (34).

³ Pathovars *mangiferaeindicae*, *anacardii* and *spondiae* are the pathovar names proposed for pathogenicity groups I, II and III, respectively.

⁴ RFLP groups as described by Gagnevin et al. (14).

⁵ Not done.

⁶ Pathotype strain.

⁷ Type strain.

⁸ Not appropriate.

Tableau 6 : annexe, souches utilisées pour l'étude taxonomique des *Xanthomonas* des Anacardiacees
(chapitre III)

Strain	Current species name	Current pathovar name	Genetic group *	Typing technique
LMG 7303	<i>X. axonopodis</i>	<i>begoniae</i>	9.1	AFLP/MLSA
LMG 551	<i>X. axonopodis</i>	<i>begoniae</i>	9.1	AFLP/MLSA
LMG 7188	<i>X. axonopodis</i>	<i>begoniae</i>	9.1	MLSA
LMG 7189	<i>X. axonopodis</i>	<i>begoniae</i>	9.1	MLSA
LMG 7596	<i>X. axonopodis</i>	<i>begoniae</i>	9.1	MLSA
LMG 497	<i>X. axonopodis</i>	<i>alfalfae</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 8019	<i>X. axonopodis</i>	<i>alfalfae</i>	9.2	AFLP/MLSA
CFBP 6107	<i>X. axonopodis</i>	<i>allii</i>	9.2	MLSA
CFBP 6367	<i>X. axonopodis</i>	<i>allii</i>	9.2	AFLP
CFBP 6369	<i>X. axonopodis</i>	<i>allii</i>	9.2	AFLP/MLSA
JW202	<i>X. axonopodis</i>	<i>allii</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 8048	<i>X. axonopodis</i>	<i>cassavae</i>	9.2	MLSA
LMG 675	<i>X. axonopodis</i>	<i>cassiae</i>	9.2	AFLP/MLSA
CFBP 3138	<i>X. axonopodis</i>	<i>citrumelo</i>	9.2	MLSA
JJ238-28	<i>X. axonopodis</i>	<i>citrumelo</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 691	<i>X. axonopodis</i>	<i>cyamopsidis</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 692	<i>X. axonopodis</i>	<i>desmodii</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 693	<i>X. axonopodis</i>	<i>desmodiigangetici</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 694	<i>X. axonopodis</i>	<i>desmodiitrotundifolii</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 757	<i>X. axonopodis</i>	<i>lespedezae</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 811	<i>X. axonopodis</i>	<i>patelii</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 844	<i>X. axonopodis</i>	<i>phyllanthi</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 849	<i>X. axonopodis</i>	<i>poinsettiicola</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 955	<i>X. axonopodis</i>	<i>tamarindi</i>	9.2	AFLP/MLSA
LMG 905	<i>X. axonopodis</i>	<i>vesicatoria</i>	9.2	AFLP
LMG 982 †	<i>X. axonopodis</i>	<i>axonopodis</i>	9.3	AFLP/MLSA
LMG 539	<i>X. axonopodis</i>	<i>axonopodis</i>	9.3	AFLP/MLSA
LMG 899	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	9.3	AFLP/MLSA
LMG 8715	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	9.3	MLSA
LMG 8716	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	9.3	MLSA
LMG 895	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	9.3	MLSA
LMG 901	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	9.3	MLSA
G14	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	9.3	MLSA
REU45	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	9.3	MLSA
REU72	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	9.3	MLSA
LMG 695	<i>X. axonopodis</i>	<i>dieffenbachiae</i>	9.4	AFLP/MLSA
LMG 12737	<i>X. axonopodis</i>	<i>dieffenbachiae</i>	9.4	MLSA
CFBP 2603	<i>X. axonopodis</i>	<i>manihotis</i>	9.4	AFLP/MLSA
CFBP 1857	<i>X. axonopodis</i>	<i>manihotis</i>	9.4	MLSA
LMG 7455	<i>X. axonopodis</i>	<i>phaseoli</i>	9.4	AFLP/MLSA
LMG 8014	<i>X. axonopodis</i>	<i>phaseoli</i>	9.4	AFLP/MLSA
CFBP 2547	<i>X. axonopodis</i>	<i>spondiae</i>	9.4	AFLP/MLSA
CFBP 2623	<i>X. axonopodis</i>	<i>spondiae</i>	9.4	AFLP/MLSA
LMG 548	<i>X. axonopodis</i>	<i>bauhiniae</i>	9.5	MLSA

Strain	Current species name	Current pathovar name	Genetic group *	Typing technique
LMG 558	<i>X. axonopodis</i>	<i>cajani</i>	9.5	AFLP/MLSA
306	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	AFLP/MLSA
NCPPB 211	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	MLSA
CFBP 2911	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	AFLP/MLSA
CFBP 2525	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	AFLP/MLSA
JJ20-3	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	AFLP/MLSA
CFBP 2855	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	AFLP/MLSA
JJ238-9	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	AFLP/MLSA
JK4-7	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	AFLP/MLSA
CFBP 2900	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	AFLP/MLSA
JW160-3	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	AFLP/MLSA
JW160-1	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	MLSA
LC27-1	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	MLSA
CFBP 2867	<i>X. axonopodis</i>	<i>citri</i>	9.5	MLSA
LMG 9045	<i>X. axonopodis</i>	<i>clitoriae</i>	9.5	AFLP/MLSA
LMG 9046	<i>X. axonopodis</i>	<i>desmodiilaxiflori</i>	9.5	AFLP/MLSA
LMG 712	<i>X. axonopodis</i>	<i>glycines</i>	9.5	AFLP/MLSA
LMG 8026	<i>X. axonopodis</i>	<i>glycines</i>	9.5	AFLP/MLSA
LMG 761	<i>X. axonopodis</i>	<i>malvacearum</i>	9.5	AFLP/MLSA
LMG 7429	<i>X. axonopodis</i>	<i>malvacearum</i>	9.5	AFLP/MLSA
CFBP 1716	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP/MLSA
CFBP 2933	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP
JV1121	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP/MLSA
CFBP 2932	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP
CFBP 2927	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP
CFBP 2935	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP/MLSA
A11-1	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP
CFBP 2916	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP
JK147-1	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP
JF30-1	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP
JP742	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	MLSA
JP758	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP
JN570	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP/MLSA
CFBP 2938	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP
CFBP 2917	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP
CFBP 2940	<i>X. axonopodis</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	9.5	AFLP
CFBP 2913	<i>X. axonopodis</i>	<i>anacardii</i>	9.6	AFLP/MLSA
CFBP 2914	<i>X. axonopodis</i>	<i>anacardii</i>	9.6	AFLP/MLSA
LA98	<i>X. axonopodis</i>	<i>anacardii</i>	9.6	AFLP/MLSA
LA100	<i>X. axonopodis</i>	<i>anacardii</i>	9.6	AFLP/MLSA
CFBP 2866	<i>X. axonopodis</i>	<i>aurantifolii</i>	9.6	AFLP
CFBP 2868	<i>X. axonopodis</i>	<i>aurantifolii</i>	9.6	AFLP
LMG 7387	<i>X. axonopodis</i>	<i>cajani</i>	9.6	AFLP/MLSA
LMG 532	<i>X. axonopodis</i>	<i>dieffenbachiae</i>	9.6	MLSA
LMG 7399	<i>X. axonopodis</i>	<i>dieffenbachiae</i>	9.6	AFLP/MLSA
LMG 7511	<i>X. axonopodis</i>	<i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	9.6	AFLP/MLSA
LMG 837	<i>X. axonopodis</i>	<i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	9.6	AFLP/MLSA
LMG 8036	<i>X. axonopodis</i>	<i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	9.6	AFLP/MLSA
LMG 8021	<i>X. axonopodis</i>	<i>rynchosiae</i>	9.6	AFLP/MLSA

Strain	Current species name	Current pathovar name	Genetic group *	Typing technique
LMG 867	<i>X. axonopodis</i>	<i>sesbaniae</i>	9.6	AFLP/MLSA
LMG 936	<i>X. axonopodis</i>	<i>vigniaeradiatae</i>	9.6	AFLP/MLSA
LMG 828	<i>X. axonopodis</i>	<i>vignicola</i>	9.6	AFLP/MLSA
LMG 8189	<i>X. axonopodis</i>	<i>vignicola</i>	9.6	AFLP/MLSA
LMG 494 ^T	<i>X. albilineans</i>			AFLP/MLSA
LMG 747 ^T	<i>X. arboricola</i>	<i>juglandis</i>		AFLP
LMG 852	<i>X. arboricola</i>	<i>pruni</i>		AFLP
LMG 947 ^T	<i>X. bromi</i>			AFLP
LMG 8267	<i>X. bromi</i>			AFLP
LMG 568 [†]	<i>X. campestris</i>	<i>campestris</i>		AFLP
LMG 535	<i>X. campestris</i>	<i>armoraciae</i>		AFLP
LMG 673 [†]	<i>X. cassavae</i>			AFLP
LMG 5267	<i>X. cassavae</i>			AFLP
LMG 8678 [†]	<i>X. codiae</i>			AFLP
LMG 8677	<i>X. codiae</i>			AFLP
LMG 690 [†]	<i>X. cucurbitae</i>			AFLP
LMG 8663	<i>X. cucurbitae</i>			AFLP
CFBP 4188 [†]	<i>X. cynarae</i>			AFLP
CFBP 4182	<i>X. cynarae</i>			AFLP
NCPPB 2968 [†]	<i>X. euvesicatoria</i>			MLSA
LMG 667	<i>X. euvesicatoria</i>			MLSA
LMG 909	<i>X. euvesicatoria</i>			AFLP/MLSA
LMG 933	<i>X. euvesicatoria</i>			AFLP
LMG 708 [†]	<i>X. fragariae</i>			MLSA
LMG 704	<i>X. fragariae</i>			MLSA
LMG 705	<i>X. fragariae</i>			MLSA
LMG 710	<i>X. fragariae</i>			AFLP
CFBP 2510	<i>X. fragariae</i>			MLSA
NCPPB 881 [†]	<i>X. gardneri</i>			MLSA
LMG 733 [†]	<i>X. hortorum</i>	<i>hederae</i>		AFLP
LMG 7314	<i>X. hortorum</i>	<i>pelargonii</i>		AFLP
LMG 739 [†]	<i>X. hyacinthi</i>			AFLP
LMG 8041	<i>X. hyacinthi</i>			AFLP
LMG 8670 [†]	<i>X. melonis</i>			AFLP
LMG 8673	<i>X. melonis</i>			AFLP
LMG 5047 [†]	<i>X. oryzae</i>	<i>oryzae</i>		AFLP
LMG 797	<i>X. oryzae</i>	<i>oryzicola</i>		AFLP
NCPPB 4321 [†]	<i>X. perforans</i>			MLSA
LMG 847 [†]	<i>X. pisi</i>			AFLP
LMG 5743 [†]	<i>X. populi</i>			AFLP
LMG 5745	<i>X. populi</i>			AFLP
LMG 471 [†]	<i>X. sacchari</i>			AFLP
LMG 472	<i>X. sacchari</i>			AFLP
LMG 8684 [†]	<i>X. theicola</i>			AFLP
LMG 8685	<i>X. theicola</i>			AFLP
LMG 876 [†]	<i>X. translucens</i>	<i>translucens</i>		AFLP
LMG 892	<i>X. translucens</i>	<i>undulosa</i>		AFLP
LMG 736 [†]	<i>X. vasicola</i>	<i>holcicola</i>		AFLP
LMG 896	<i>X. vasicola</i>	<i>vasculorum</i>		AFLP

Strain	Current species name	Current pathovar name	Genetic group *	Typing technique
LMG 900	<i>X. vasicola</i>	<i>vasculorum</i>		AFLP
LMG 911 †	<i>X. vesicatoria</i>			AFLP/MLSA
LMG 919	<i>X. vesicatoria</i>			AFLP/MLSA
LMG 917	<i>X. vesicatoria</i>			MLSA
LMG 920	<i>X. vesicatoria</i>			MLSA
LMG 923	<i>X. vesicatoria</i>			MLSA
LA250	<i>Xanthomonas</i> sp.	Isolated from pistachio		AFLP
LA253	<i>Xanthomonas</i> sp.	Isolated from pistachio		AFLP
CFBP 2924	<i>Xanthomonas</i> sp.	Isolated from mango		AFLP
JQ766	<i>Xanthomonas</i> sp.	Isolated from mango		AFLP
JQ770	<i>Xanthomonas</i> sp.	Isolated from mango		AFLP
stema279a	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			MLSA